

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**VALÉRIA PEREIRA FERRER**

**CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE HIALURONIDASE E  
ALÉRGENO PRESENTES NO VENENO DE ARANHA MARROM (*Loxosceles  
intermedia*)**

**CURITIBA**

**2010**

Ferrer, Valéria Pereira

**Clonagem e Expressão Heteróloga de Hialuronidase e Alérgeno presentes no veneno de aranha marrom (*Loxosceles intermedia*)**

Curitiba, 2010. 102p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná – UFPR

1.aranha. 2.*Loxosceles intermedia*. 3.alérgeno. 4.hialuronidase.

**VALÉRIA PEREIRA FERRER**

**CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE HIALURONIDASE E  
ALÉRGENO PRESENTES NO VENENO DE ARANHA MARROM (*Loxosceles  
intermedia*)**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular como parte das exigências para obtenção do título de Mestre. Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

Co-orientadora: Prof. Dra. Andrea Senff Ribeiro

**CURITIBA**

**2010**

*Aos **meus pais** e **irmãos** por terem compartilhado o meu crescimento pessoal e profissional durante esses anos e terem sido os alicerces de minha educação. Não apenas forneceram condições para minha educação acadêmica, mas também serviram de exemplo e me ajudaram no aprendizado para vida. Cada um ao seu modo incentivou e apoiou a carreira científica que escolhi, sendo compreensivos sempre que necessário. A vocês dedico este trabalho.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por ter me fornecido saúde e discernimento para a realização deste trabalho. Certamente nos momentos de cansaço e desânimo foi a certeza de que existe uma Força Superior a me guiar que deu a coragem necessária para seguir em frente.

Ao meu orientador Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga pelo exemplo de honestidade e competência profissional; pela oportunidade de ingresso no laboratório e pelos inúmeros divertidos e polêmicos almoços no RU. Conviver com você esses anos me propiciou um grande aprendizado.

À minha co-orientadora Prof. Dra. Andrea Senff Ribeiro por ser um exemplo de competência em tudo o que faz, pelo realismo que possui e pela ajuda fornecida durante várias etapas deste trabalho. Todas às vezes que foi preciso eu pude contar com você.

Ao Prof. Dr. Rafael Bertoni da Silveira por ser um espelho de dedicação à ciência e por ter sido meu primeiro orientador na bancada. Serei sempre grata à pessoa que me ensinou a micropipetar. Durante um convívio praticamente diário na minha graduação você me repassou inúmeros conhecimentos e durante o desenvolvimento deste trabalho esteve disposto a me ajudar nas vezes em que precisei de dicas e opiniões.

À Prof. Dra. Olga Meiri Chaim pela paciência e todo ensinamento técnico-científico repassado: você é uma fonte de conhecimento e cultura. Gostaria de agradecer também pela amizade desses anos e pelo voto de confiança sempre depositado. Em você tenho um exemplo de educadora: exige e repassa conhecimento, mas, está sempre a escutar e aprender com os demais.

À Prof. Dra. Marcia Helena Appel pela paciência e disponibilidade oferecidas durante a iniciação científica e pelas inúmeras vezes em que precisei de reagentes, protocolos e opiniões no decorrer deste trabalho. Pela amizade e exemplo de pessoa capaz e correta que é.

À Prof Dra. Katia Sabrina Paludo e à quase doutora Msc. Luiza Helena Gremski por toda a paciência que tiveram no meu início no laboratório. Pelo apoio, incentivo e confiança sempre depositados. Obrigada pela amizade compartilhada durante esses anos e por serem pessoas tão verdadeiras e dispostas a ajudar no que for preciso.

À Msc. Dilza Trevisan Silva pelos inúmeros momentos de aprendizado divididos durante os anos de iniciação científica e mestrado. Por ser exemplo de paixão pelo o que faz, pela amizade, apoio e ajuda em todos os momentos.

Ao Msc. Youssef Bacila Sade por ser exemplo de capacidade, pelas conversas polêmicas instigadas, pela amizade sem interesse e por nunca precisar pensar duas vezes em pedir sua ajuda no que precisei, afinal, sabia que podia contar com você.

À Msc. Daniele Chaves Moreira pela amizade compartilhada desde a iniciação, pelas diversas caronas e conversas divididas. Pelo exemplo de determinação e pelo apoio oferecido.

À “Nova Liga Biomol”: Msc. Jenifer Nowatski e Fernando Hitomi Matsubara pela amizade e convivência intensa durante esse último ano. Aprendi muito com vocês, mesmo nos momentos em que parecia que era eu quem estava ensinando. Certamente vocês me ajudaram a fazer dias tensos tornarem-se divertidos, obrigada por todo apoio e ajuda.

A todos os alunos de iniciação científica do laboratório: Gabriel, Fernanda, Mariana, Bruna e em especial os meus pupilos mais próximos Thiago e Isabela, pela amizade e auxílio oferecidos tantas vezes.

Aos ex-integrantes do Laboratório de Matriz Extracelular Msc. Rodrigo Otávio Schneider, Msc. Josiana Kusma e Sandra Evangelista, os quais também dividiram momentos de trabalho e amizade dentro do laboratório e foram importantes para o meu crescimento.

Ao Prof. Dr. Waldemiro Gremski pelas aulas exemplares, pela dedicação e paixão à ciência e à Prof. Dra. Roseli Wassem por ter sido minha primeira orientadora de iniciação científica, pelo apoio e compreensão às minhas decisões.

Aos porteiros do Setor de Ciências biológicas “Seu Tião” e “Seu Luiz” pelas pequenas conversas e muitos bons dias! A simplicidade de vocês me ajudou a manter os pés no chão e a sempre lembrar os verdadeiros valores da vida.

Aos amigos e colegas de laboratórios vizinhos, PUC- São José e ICC. Em especial, às Msc. Gina Borghetti, Daniele Pequito, Taísa Adamowicz, Chelin Steclan e Adriana Umaki: pela disponibilidade de empréstimos, auxílios laboratoriais e principalmente pela amizade dedicada neste tempo, vocês foram extremamente importantes.

Às minhas amigas Mariza Pondé e Andressa Cunha e aos meus amigos de graduação; especialmente, Viviane Sawanoi, Francine Aleixo, Suély Weiss, Daniele Vieira, Mariliz Buba e Msc. Thiago Jacomasso por confiarem na minha carreira científica desde o início e pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis.

Aos meus pais por terem dedicado muito de suas vidas para que eu pudesse ter a melhor educação possível. Por serem exemplos de força de vontade e superação e por todo o carinho oferecido durante esses anos. Vocês aprenderam a compreender minha paixão pela ciência, o que foi essencial para a realização deste trabalho.

Aos meus irmãos e familiares pelo apoio, incentivo e compreensão de minha ausência em diversos momentos.

À CAPES, CNPq, SETI e Fundação Araucária pelo apoio financeiro aos projetos do laboratório.

***“A mente que se abre a uma nova idéia, jamais  
voltará ao seu tamanho original”.***

*Albert Einstein*



## RESUMO

Loxoscelismo é a denominação do quadro clínico provocado em indivíduos picados por aranhas do gênero *Loxosceles*. No estado do Paraná, os acidentes com este gênero são problema de saúde pública, em especial na cidade de Curitiba e Região Metropolitana, consideradas áreas endêmicas para o loxoscelismo. O veneno de *Loxosceles* é composto por uma mistura de toxinas de natureza essencialmente protéica, capazes de causar lesões dermonecroticas com espalhamento gravitacional e manifestações sistêmicas tais como agregação plaquetária, anemia hemolítica, falência renal aguda e *rash* cutâneo. Nos venenos de aranhas do gênero *Loxosceles* foram descritas toxinas como fosfolipases-D, serinoproteases, metaloproteases, hialuronidases, entre outras. Estudos bioquímicos revelaram a presença de hialuronidases de 41 e 43KDa no veneno de *L. intermedia*. Hialuronidases são enzimas que degradam componentes da matriz extracelular facilitando a penetração das outras toxinas em tecidos adjacentes ao local de inoculação do veneno, sendo referida como “fator de espalhamento gravitacional”. No veneno de *L. intermedia* outros componentes além da histamina são relatados como responsáveis pela degranulação de mastócitos e pelos eventos inflamatórios. Para melhor compreensão dos quadros loxoscélicos, este trabalho teve como objetivo a clonagem e expressão de duas novas toxinas do veneno de *L. intermedia*: hialuronidase e alérgeno. Parte da sequência do alérgeno de *L. intermedia* era conhecida por meio da análise da biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno. Através de técnicas de biologia molecular e desenhando oligonucleotídeos específicos para esta sequência foi possível obter a sequência completa desta toxina, a qual foi subclonada em plasmídeo de expressão pET-14b utilizando oligonucleotídeos com sítios de restrição para XhoI e BamHI. No caso da hialuronidase, os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados por meio da análise de sequências de hialuronidase de várias espécies e, com auxílio de técnicas específicas, foi possível obter a sequência completa desta enzima, a qual foi subclonada em pET-14b com auxílio de *primers* que continham sítios de restrição para as enzimas NdeI e BamHI. Com o teste de indução desta proteína recombinante em cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS foi padronizado que a condição de expressão desta seria com 0,05mM de indutor (IPTG) por 3,5h. Porém, nas temperaturas de 16°C a 30°C a proteína foi expressa e encontrava-se como corpos de inclusão. A expressão em pequena escala com uma cepa alternativa (*E. coli* AD494(DE3)) demonstrou que na expressão à 30°C com 0,05mM-0,4mM de IPTG por 5h existe uma fração da hialuronidase recombinante expressa em sua forma solúvel. Os dados do trabalho inauguram a possibilidade de expressão de alérgeno e hialuronidase em grande escala e purificação em cromatografia de afinidade, para que assim sejam realizadas a avaliação de suas atividades biológicas.

**Palavras-chave:** aranha, *Loxosceles intermedia*, alérgeno, hialuronidase

## ABSTRACT

Loxoscelism is the term used to describe the clinical symptoms evoked in victims of accidents with spiders of the *Loxosceles* genus. In the State of Parana, accidents involving this genus are a public health problem, especially in the city of Curitiba and metropolitan region, which are considered endemic areas for loxoscelism. *Loxosceles* venom is a mixture of toxins, essentially proteins, capable of causing dermonecrotic lesions with gravitational spreading and systemic manifestations such as platelet aggregation, hemolytic anemia, acute renal failure and cutaneous rash. Toxins as phospholipases-D, serineproteases, metalloproteases, hyaluronidases, among others were already described in the venom of spiders of the genus. Biochemical studies showed hyaluronidase activities at 41 and 43KDa in *Loxosceles intermedia* whole venom. Hyaluronidases are enzymes that degrade extracellular matrix components and may act increasing the spread of other toxins in adjacent tissues of the inoculation site of venom. Due to this activity, hyaluronidases are popularly known as "spreading factors". In venom of *Loxosceles intermedia* other components aside from histamine are reported be responsible for mast cell degranulation and inflammatory events. In order to expand the knowledge of loxoscelism this work has aimed the cloning and expression of two new toxins of *Loxosceles intermedia* venom: hyaluronidase and allergen. Analysis of cDNA library of *L. intermedia* venom gland identified a partial sequence encoding an allergen. By means of molecular biology techniques and by designing specific primers for this sequence it was possible to obtain the complete sequence of the allergen, which was then subcloned into the expression vector pET-14b using primers with restriction sites for XhoI and BamHI enzymes. In the case of hyaluronidase, primers were designed by analyzing the sequences of hyaluronidases from several species. Then, using specific techniques it was possible to obtain the full sequence of this enzyme, which was cloned with primers with restriction sites for NdeI and BamHI enzymes. After induction trials for this recombinant protein in *E. coli* BL21(DE3)pLysS it was standardized an expression condition of 0,05mM IPTG during 3,5h. However between 16°C-30°C temperatures the protein was expressed in the form of inclusion bodies. A small scale expression in a different strain (*E. coli* AD494(DE3)) using induction parameters of 0,05mM-0,4mM of IPTG during 5h at 30°C resulted in part of recombinant hyaluronidase in the soluble form. The data of this work give conditions for expression of hyaluronidase and allergen in large scale as well as purification in affinity chromatography so that will allow the evaluation of their biological activities.

**Keywords:** spider, *Loxosceles intermedia*, allergen, hyaluronidase.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ARANHA MARROM ( <i>Loxosceles sp</i> ) .....	20
FIGURA 2 - DIMORFISMO SEXUAL ( <i>L. intermedia</i> ) .....	22
FIGURA 3 - ACIDENTES ENTRE OS ANOS DE 2001 E 2007 EM CURITIBA-PR .....	22
FIGURA 4 - LESÃO DERMONECRÓTICA .....	24
FIGURA 5 - LESÃO DERMONECRÓTICA DE DIFÍCIL CICATRIZAÇÃO .....	25
FIGURA 6 - PONTOS DE CLIVAGEM DE HIALURONIDASES EM ÁCIDO HIALURÔNICO .....	32
FIGURA 7 - RNA TOTAL DAS GLÂNDULAS PRODUTORAS DE VENENO DE <i>L. intermedia</i> .....	53
FIGURA 8 – 5'-RACE DO ALÉRGENO DE <i>L. intermedia</i> .....	54
FIGURA 9 - CLONAGEM DA PROTEÍNA COMPLETA .....	56
FIGURA 10 - SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS E AMINOACÍDICAS DE ALÉRGENO DE <i>L. intermedia</i> .....	57
FIGURA 11 - SIMILARIDADE DO ALÉRGENO DE <i>L. intermedia</i> COM ALÉRGENOS DE OUTROS ARTRÓPODES.....	59
FIGURA 12 - PCR DA LIGAÇÃO. ....	62
FIGURA 13 – SUBCLONAGEM DO ALÉRGENO DE <i>L. intermedia</i> EM pET-14b. ....	63
FIGURA 14 - ELETROFORESE DO PRODUTO DE RT-PCR (3'RACE) DE HIALURONIDASE DE <i>L.intermedia</i> . ....	65

FIGURA 15 - 5'RACE DA HIALURONIDASE DE <i>L. intermedia</i> .....	67
FIGURA 16 - CLONAGEM DA PROTEÍNA COMPLETA. ....	68
FIGURA 17 - SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS E AMINOACÍDICAS DE HIALURONIDASE DE <i>L. intermedia</i> . ....	69
FIGURA 18- SIMILARIDADE DE HIALURONIDASE DE <i>L. intermedia</i> COM HIALURONIDASES DE OUTRAS ESPÉCIES.....	71
FIGURA 19 – SUBCLONAGEM DA HIALURONIDASE DE <i>L. intermedia</i> .....	74
FIGURA 20 - TESTE DE INDUÇÃO PARA EXPRESSÃO DE HIALURONIDASE DE <i>L.intermedia</i> EM BL21(DE3)pLysS.....	75
FIGURA 21 - TESTE DE INDUÇÃO PARA EXPRESSÃO DE HIALURONIDASE DE <i>L.intermedia</i> EM BL21(DE3)pLysS.....	76
FIGURA 22 - TESTE DE INDUÇÃO PARA EXPRESSÃO DE HIALURONIDASE DE <i>L.intermedia</i> EM AD494(DE3).....	78
FIGURA 23 – TESTE DE SOLUBILIDADE DE HIALURONIDASE DE <i>L.intermedia</i> EM AD494(DE3).....	79

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DOS ACIDENTES POR <i>Loxosceles</i> E SEUS RESPECTIVOS TRATAMENTOS.....	28
TABELA 2 - PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E BIOFÍSICAS DE HIALURONIDASES DE VENENOS ANIMAIS .....	33
TABELA 3 - DIFERENTES CLASSES DE INIBIDORES DE HIALURONIDASES .....	36
TABELA 4 - ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS DE PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS DE VENENO DE INSETOS ACESSÍVEL ATRAVÉS DO <i>ENTREZ</i> .....	39
TABELA 5 – IDENTIDADE AMINOACÍDICA ENTRE ALÉRGENO DE <i>L. intermedia</i> E ALÉRGENOS DE DIFERENTES ESPÉCIES.....	60
TABELA 6 – IDENTIDADE AMINOACÍDICA ENTRE HIALURONIDASE DE <i>L.intermedia</i> E HIALURONIDASES DE OUTRAS ESPÉCIES .....	72

## ABREVIATURAS E SIGLAS

3'- RACE: do Inglês, *Rapid Amplification of 3' cDNA End*

5'- RACE: do Inglês, *Rapid Amplification of 5' cDNA End*

APS : Persulfato de amônio

BLAST: do Inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*

BOD : do Inglês, *Biological Oxygen Demand*

cDNA : DNA complementar

CIAP: do Inglês, *Calf Intestine Alkaline Phosphatase*

D.O. : Densidade óptica

DEPC: dietilpirocarbonato

DNA : Ácido desoxirribonucleico

dNTPs : Desoxirribonucleotídeos fosfatados

EDTA : Ácido etilenodiaminotetra-acético

g : Grama

IPTG : Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo

IRA: Insuficiência renal aguda.

KCl: Cloreto de potássio

kDa: quilodaltons (unidade de massa molecular equivalente a mil daltons)

L : Litro

LB : Luria-Bertani

M : Mol por litro

mg : Miligrama

MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de magnésio

MgSO<sub>4</sub>: Sulfato de Magnésio

mL : Mililitro

mM : Milimol por litro

mRNA : RNA mensageiro

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: Fosfato de sódio dibásico

NaCl: Cloreto de sódio

nm : Nanômetros

PCR : Reação em cadeia da polimerase

pH : Potencial de hidrogeniônico

pI : Ponto isoelétrico

RNA : Ácido ribonucléico

rpm: rotações por minuto

RT-PCR: transcrição reversa acoplada à reação em cadeia da polimerase

SDS : do Inglês, Dodecilsulfato de Sódio

SDS-PAGE : do Inglês, *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

TAE: tampão Tris-acetato-EDTA

TEMED : N,N,N'N'-dimetilaminoetano

Tm: temperatura de desnaturação

UFPR : Universidade Federal do Paraná

V : Volts

v/v: proporção volume/volume

ZnCl<sub>2</sub>: Cloreto de zinco

µg : Micrograma

µL : Microlitro

µM : Micromol por litro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>19</b>
3.1 ARANHAS: CONSIDERAÇÕES GERAIS E GÊNERO <i>Loxosceles</i> sp.	19
3.2 EPIDEMIOLOGIA DA <i>Loxosceles</i> sp.	21
3.3 LOXOSCELISMO	23
3.3.1 Loxoscelismo Cutâneo	23
3.3.2 Loxoscelismo sistêmico	26
3.3.3 Diagnóstico e Tratamento do Loxoscelismo	27
3.4 COMPOSIÇÃO DOS VENENOS LOXOSCÉLICOS E MECANISMOS MOLECULARES DE AÇÃO DESTES	29
3.5 HIALURONIDASES	31
3.5.1 Aplicações médicas e biotecnológicas	34
3.5.2 Envolvimento fisio-patológico da atividade de hialuronidases	35
3.6 ALERGIA	36
3.6.1 Alérgenos em venenos animais	38
3.6.1.1 Aplicações médicas e biotecnológicas de alérgenos	39
3.6.2 Eventos inflamatórios de venenos animais são dependentes da atividade de mastócitos	40
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>42</b>
4.1 REAGENTES	42
4.2 ANIMAIS	42
4.3 EXTRAÇÃO DO VENENO POR ELETROCHOQUE	42
4.4 ELETROFORESE	43
4.4.1 Eletroforese em agarose	43
4.4.2 SDS-PAGE	43
4.5 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DA GLÂNDULA PRODUTORA DE VENENO DE <i>Loxosceles intermedia</i>	43
4.6 QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA INTEGRIDADE DO RNA TOTAL EXTRAÍDO	43
4.7 TRANSCRIÇÃO REVERSA ACOPLADA À REAÇÃO DE CADEIA DA POLIMERASE	44
4.7.1 <i>Rapid Amplification of 5'cDNA End (5' - RACE)</i>	44
4.7.2 <i>Rapid Amplification of 3'cDNA End (3' - RACE)</i>	45
4.8 EXTRAÇÃO DOS FRAGMENTOS DO GEL DE AGAROSE	45
4.9 Ligação EM pGEM-T	46
4.10 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO	46
4.11 PLAQUEAMENTO DAS BACTÉRIAS TRANSFORMADAS	46
4.12 PCR DE COLÔNIA	46
4.13 MINI PREPARAÇÃO PLASMIDIAL	47
4.14 REAÇÃO E ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO	47
4.15 PCR COM Pfu DNA POLIMERASE	48
4.16 SUBCLONAGEM	48
4.17 ANÁLISE DA PROTEÍNA MADURA	49
4.18 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	50
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>52</b>
5.1 5'-RACE DO ALÉRGENO de <i>L. intermedia</i>	52
5.2 CLONAGEM DA SEQUÊNCIA COMPLETA DO ALÉRGENO	55
5.3 SUBCLONAGEM DO ALÉRGENO DE <i>L. intermedia</i>	61
5.4 3'RACE DE HIALURONIDASE DE <i>L. intermedia</i>	63



5.5 CLONAGEM DA SEQUÊNCIA COMPLETA DO cDNA DA HIALURONIDASE.....	67
5.6 SUBCLONAGEM DO cDNA DA HIALURONIDASE DE <i>L. intermedia</i> .....	72
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>98</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Representantes do gênero *Loxosceles* sp. estão amplamente espalhados pelos cinco continentes mundiais (GOMEZ *et al.*, 2001). Sabe-se atualmente da existência de 10 espécies deste gênero no Brasil (PLATNICK, 2007). Dentre essas, apenas três espécies (*L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*) estão envolvidas nos casos de envenenamento humano, justamente pela facilidade em se adaptar ao ambiente, e por serem sinantrópicas, isto é, adaptadas ao ambiente intradomiciliar. *L. intermedia* responde por grande parte dos acidentes na região sul do País (MÁLAQUE *et al.*, 2002). Curitiba e Região Metropolitana são responsáveis por 59,21% das notificações nacionais de acidentes com *Loxosceles* e por 78,12% das notificações estaduais envolvendo estes animais (SINAN, 2009).

O termo loxoscelismo é tipicamente utilizado para descrever os sinais e sintomas resultantes de acidentes envolvendo aranhas do gênero *Loxosceles* (da SILVA *et al.*, 2004). Tal envenenamento pode ser caracterizado por duas variantes clínicas: loxoscelismo cutâneo e loxoscelismo sistêmico (FUTRELL, 1992). O loxoscelismo cutâneo é predominante nos acidentes (ocorre em 84 a 97% dos casos) e caracteriza-se por hemorragia local e lesão dermonecrotica com espalhamento gravitacional algumas horas após o acidente. O loxoscelismo sistêmico é observado somente em 3 a 16% dos casos, seus sintomas geralmente iniciam 24 horas após a picada e são caracterizados por distúrbios da hemostase e função renal; em casos mais raros, exantema generalizado e morte (FUTRELL, 1992; LUNG; MALLORY, 2000; da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005; CHAIM *et al.*, 2006; PIPPIRS *et al.*, 2009).

Histologias que avaliaram o efeito do veneno de *L. intermedia* em derme de coelho foram descritas causar uma deposição de rede de fibrina intravascular, trombose dos vasos sanguíneos da derme, degeneração das paredes dos vasos, agregação e infiltração de células inflamatórias. O músculo esquelético foi marcadamente infiltrado por neutrófilos, foi evidenciado edema e mionecrose de algumas fibrilas (OSPEDAL *et al.*, 2002).

Recentemente, trabalhos relacionaram o papel de mastócitos e de receptores de histamina com a atividade inflamatória do veneno. A histamina é uma bioamina classicamente envolvida com o desenvolvimento de quadros de inflamação aguda e reações de hipersensibilidade. Além da histamina presente no veneno, foi sugerido

que outros componentes deste podem estar envolvidos na liberação da histamina de mastócitos (RATTMANN *et al.*, 2008; PALUDO *et al.*, 2009).

O veneno loxoscélico é uma mistura essencialmente protéica de compostos biologicamente ativos, o qual demonstra presença abundante de enzimas em sua composição. Análises eletroforéticas revelam a presença maciça de proteínas de baixa massa molecular (3-45KDa) (MARTINEZ-VARGAS, 1987).

As toxinas dermonecróticas, esfingomielinases-D, são as melhores caracterizadas nos venenos de aranhas marrons. Estudos anteriores identificaram estas como contribuintes para o maior efeito tóxico do veneno de aranhas marrons, que inclui hemólise (FORRESTER, 1978), agregação plaquetária (KURPIEWSKI, 1981), a típica lesão dermonecrótica (FUTREL, 1982; da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2006), assim como o edema e aumento da permeabilidade vascular (PALUDO *et al.*, 2009).

Outras enzimas, como metaloproteases, serinoproteases, fosfatases alcalinas e hialuronidases já foram também descritas em venenos de diferentes espécies de *Loxosceles* (FUTRELL, 1992; da SILVA *et al.*, 2004; de CASTRO *et al.*, 2004).

Hialuronidases são conhecidas em diversos venenos como o “fator de espalhamento gravitacional”. Esta toxina pode degradar constituintes da matriz extracelular e ajudar na desorganização do tecido. Sua presença potencializaria a ação de outros componentes do veneno no sentido de facilitar a penetração destes em vários tecidos até a circulação sanguínea (KEMPARAJU; GIRISH, 2006; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). Além disso, hialuronidases têm sido relatadas como um “fator alergênico”, contribuinte de reações de hipersensibilidade em alguns venenos de animais (LU *et al.*, 1995; KOLARICH *et al.*, 2005).

Atualmente diversos estudos estão direcionados na caracterização de componentes isolados do veneno para um maior entendimento do loxoscelismo e desenvolvimento de metodologias terapêuticas mais eficazes no tratamento. A produção de proteínas recombinantes representa um grande avanço na determinação da atividade tóxica do veneno de aranha marrom e diante da diversidade de toxinas presentes nestes venenos, com as mais variadas atividades bioquímicas e farmacológicas, fica cada vez mais evidente o potencial destas moléculas para emprego como insumos biotecnológicos, tanto como ferramentas de estudo ou diagnóstico (SOUTAR; GINSBERG, 1993; MARKLAND, 1998; KEMPARAJU; GIRISH, 2006; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Clonagem, expressão heteróloga e caracterização de hialuronidase e alérgeno presentes no veneno de *Loxosceles intermedia* (aranha marrom).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificação do cDNA que codifica uma isoforma de hialuronidase de *L. intermedia*;
- Identificação do cDNA que codifica o alérgeno de *L. intermedia* a partir de uma parte da sequência conhecida da biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno;
- Obtenção de alérgeno e hialuronidase recombinantes por meio de subclonagem em plasmídeo de expressão;
- Padronização das melhores condições de expressão heteróloga e purificação para as duas toxinas;
- Caracterização da atividade bioquímica e biológica do alérgeno e hialuronidase recombinantes de *L. intermedia*.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 ARANHAS: CONSIDERAÇÕES GERAIS E GÊNERO *Loxosceles* sp.

O filo *Arthropoda* (grego. *Arthros* = articulação + *podos* = pé) possui a maior diversidade em número de espécies do reino *Animalia*. Atualmente, pode ser dividido em dois táxons: *Mandibulata* e *Chelicerata*. Os quelicerados são, em sua maioria, artrópodes terrestres e tal táxon é composto pela classe dos aracnídeos – animais popularmente conhecidos como aranhas, escorpiões, carrapatos, ácaros e opiliões (RUPPERT *et al.*, 2004).

O fóssil mais antigo de aranha é datado de 300 milhões de anos e já existem cerca de 40.000 espécies de aranhas descritas (PLATNICK, 1993). Acidentes com aranhas são amplamente relatados e as espécies mais perigosas pertencem ao grupo *Labidognatha* ou *Araneomorfa*, espécimes deste grupo tem ferrões inoculadores de veneno perpendiculares ao eixo longitudinal do corpo. Entre elas, destacam-se aranhas de três gêneros responsáveis por casos graves de envenenamento: *Lactrodectus* (viúva negra), *Phoneutria* (armadeira) e *Loxosceles* (aranha marrom ou violino) (ESCOUBAS *et al.*, 2000; APPEL *et al.*, 2005).

As aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem à família *Loxoscelidae* (*Sicariidae*), subordem *Labidognatha*, ordem *Araneida*, classe *Arachnida* e filo *Arthropoda* (PLATNICK, 1993; PLATNICK, 2008). São conhecidas popularmente como aranhas marrons, pois as aranhas desse gênero apresentam colorido uniforme que varia de marrom claro até marrom escuro, ou também como aranhas-violino (FIGURA 1) por possuírem um desenho no cefalotórax que lembra um violino (FUTRELL, 1992; PETERSON, 2006). A variação de coloração entre as diferentes aranhas do gênero *Loxosceles* auxilia na identificação das espécies (TAVARES, 2007).

São aranhas de pequeno porte que possuem comprimento corporal entre 4 e 15 mm, enquanto suas pernas medem de 8 a 30 mm. Possuem três pares de olhos brancos brilhantes reunidos em semicírculo (FIGURA 1) sobre o cefalotórax (BUCHERL, 1956; BUCHERL, 1969). Os machos possuem corpo menor e pernas relativamente mais longas do que as fêmeas (FIGURA 2). Possuem hábitos noturnos, são sedentárias e não agressivas - sendo que a maioria dos acidentes ocorre quando as pessoas comprimem a aranha inadvertidamente no ato de vestir-

se, calçar-se, enxugar-se ou durante o sono. Preferindo a escuridão, algumas vivem sob pedras, troncos de árvores, restos vegetais, telhas e tijolos empilhados, mas podem adquirir hábitos intradomiciliares sob condições especiais: atrás de quadros, no meio de roupas, livros e outros objetos (FUTRELL, 1992; SCHENONE; PRATS, 1961; SCHENONE; LETONJA, 1975; LUCAS, 1988; BÜCHERL, 1960-62; BUCHERL, 1969; FISCHER, 1996; RIBEIRO *et al.*, 1993).



FIGURA 1 - ARANHA MARROM (*Loxosceles* sp). Em detalhe na flecha branca a forma de violino no cefalotórax característico deste gênero e na estrela vermelha a disposição dos 3 pares de olhos em semicírculo.

Estas aranhas possuem grande capacidade de adaptação, suportando amplas variações de temperatura (8 a 43 °C), bem como longos períodos sem comida (276 dias) e água (da SILVA *et al.*, 2004; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008).

O veneno é produzido em uma glândula que possui epitélio secretor revestido por membrana basal e duas camadas de músculo estriado, uma interna e outra externa. As células do epitélio secretório são ricas em vesículas contendo veneno. A morfologia das glândulas e das células indica que o tipo de secreção é holócrina. O volume de veneno inoculado pela aranha é em torno de 4  $\mu$ L e dados sugerem que cerca de 60 a 100  $\mu$ g de proteínas são inoculados no momento da picada (dos SANTOS *et al.*, 2000; da SILVA *et al.*, 2004).



FIGURA 2 - DIMORFISMO SEXUAL (*L. intermedia*) ADAPTADO DE: da SILVA *et al.* (2004).

### 3.2 EPIDEMIOLOGIA DA *Loxosceles* sp.

Representantes do gênero *Loxosceles* sp. estão amplamente espalhados pelo mundo e são encontrados nos cinco continentes. No continente americano provavelmente está a maior diversidade de espécies, sendo relatado cerca de 50 apenas na América do Norte (GOMEZ *et al.*, 2001) e cerca de 30 espécies na América do Sul (GERTSCH, 1967). Sabe-se atualmente da existência de 10 espécies deste gênero no Brasil (PLATNICK, 2007). O loxoscelismo é mais frequente na região Sul do País, que contabilizou 95% dos casos envolvendo aranhas ao gênero *Loxosceles* entre os anos de 1990 e 1993. Na cidade de Curitiba (PR) e região metropolitana são relatados em torno de dois a três mil casos por ano (FIGURA 3B). Apesar de a espécie *L. laeta* possuir uma distribuição geográfica mais ampla e ser encontrada nos mesmos locais que a *L. intermedia*, esta última responde por grande parte dos acidentes na região sul do País (GONÇALVES DE ANDRADE; LOURENÇO; TAMBOURGI, 2000; MÁLAQUE *et al.*, 2002) e é a espécie predominante no município de Curitiba. Embora no Paraná são encontradas também



as espécies *L. gaucho*; *L. laeta* e *L. hirsuta* (MELLO-LEITÃO, 1934; MARQUES DA SILVA; FISCHER, 2000).

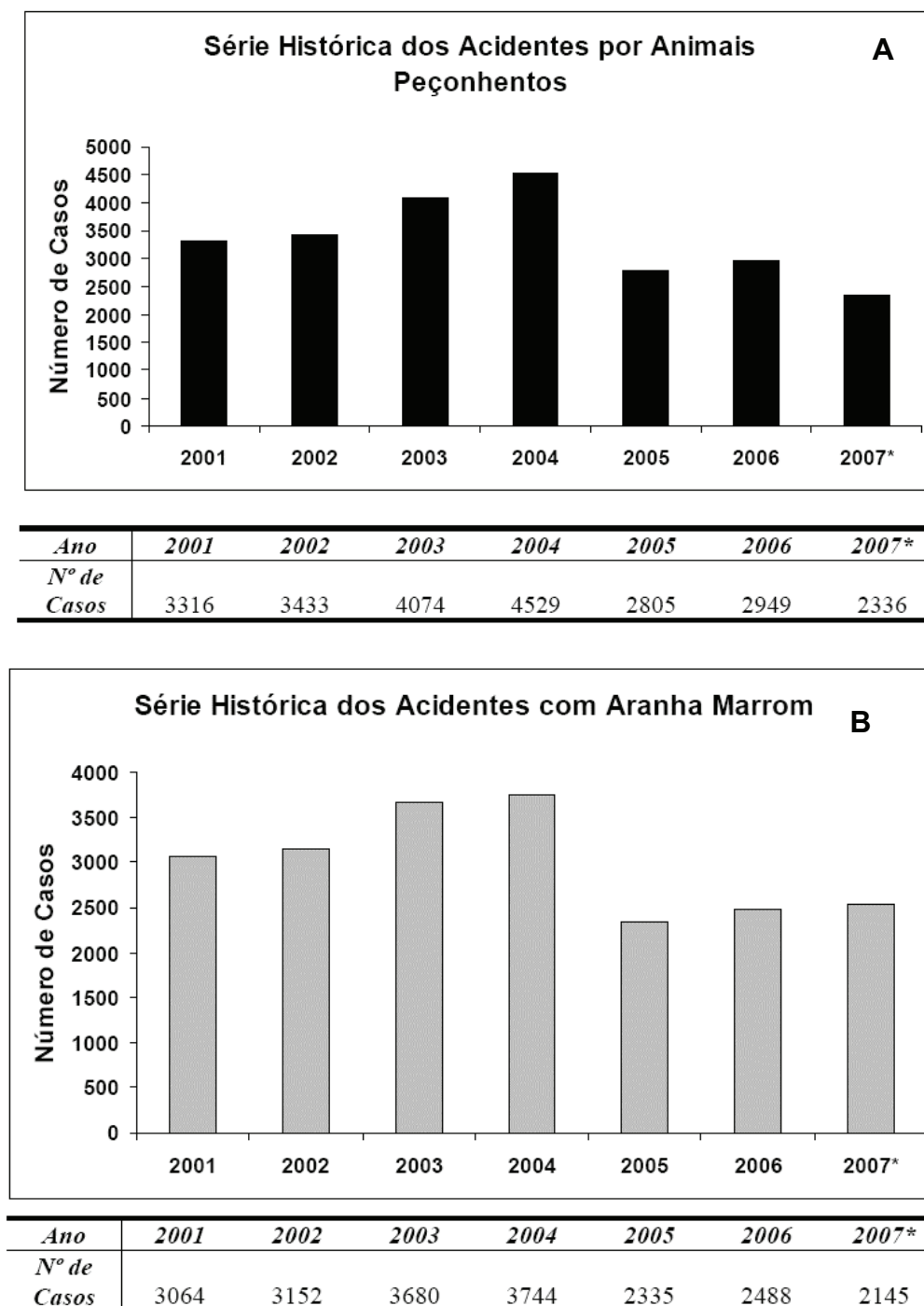


FIGURA 3: ACIDENTES ENTRE OS ANOS DE 2001 E 2007 EM CURITIBA-PR. (A) Por animais peçonhentos (B) Por aranha marrom. Dados preliminares até julho de 2007.  
 FONTE: SMS/CE/CVE – SINAN, Boletim Epidemiológico de Curitiba.

Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde (SINAN), acidentes com aranhas estão em terceiro lugar na lista de acidentes com animais peçonhentos notificados no período de 2001 a 2008,



representando 18,55% do total de acidentes notificados com gênero do animal identificado. O Estado do Paraná concentra 47,86% de todos os casos envolvendo aranhas, sendo o primeiro estado em número de acidentes envolvendo este tipo de animal e o segundo estado em número de acidentes com animais peçonhentos. No mesmo período, do total de acidentes com aranhas, considerando-se somente as notificações com identificação do animal, o gênero *Loxosceles* responde por 65,33% dos casos. Curitiba e Região Metropolitana são responsáveis por 59,21% das notificações nacionais de acidentes com *Loxosceles* e por 78,12% das notificações estaduais envolvendo estes animais (SINAN, 2009). O menor número de acidentes com aranhas marrons ocorre no inverno. A partir da primavera os casos voltam a subir, tendo o seu pico no verão. (SCHENONE; LETONJA, 1975; SINAN, 2009).

### 3.3 LOXOSCELISMO

As aranhas do gênero *Loxosceles* sp. provocam nos acidentados um conjunto de sinais e sintomas denominado loxoscelismo, que pode estar relacionado a dois quadros clínicos distintos: o quadro cutâneo ou dermonecrótico (84-97% dos casos) e o quadro cutâneo-visceral ou sistêmico (3-16% dos casos) (BARBARO *et al.*, 1992; da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005).

A evolução e severidade de um acidente loxoscélico e o desenvolvimento de um ou ambos os quadros clínicos dependem de inúmeros fatores, tais como a espécie de aranha marrom, o sexo da aranha, o estágio de desenvolvimento da aranha, a quantidade e composição do veneno inoculado. Além disso, podem ser influenciados também pela susceptibilidade individual do acidentado ao veneno, pelo local da picada e o tempo que o acidentado leva para procurar diagnóstico e tratamento adequados (GAJARDOTOBAR, 1966; BARRETO *et al.*, 1985; SCHENONE *et al.*, 1989; BARBARO *et al.*, 1994b; SEZERINO *et al.*, 1998; Ministério da Saúde, 1998; ANDRADE *et al.*, 1999).

#### 3.3.1 Loxoscelismo Cutâneo

O loxoscelismo cutâneo caracteriza-se por uma lesão dermonecrótica com espalhamento gravitacional (FIGURA 4). A picada da aranha marrom é praticamente indolor e por isso muitas vezes passa despercebida pelos indivíduos acidentados.

Após 2 a 8 horas, surge dor que pode variar de moderada a severa e é descrita como dor local do tipo “queimação”. Estes sintomas, inicialmente, podem estar associados a um pequeno ponto de eritema transiente e edema. Entre 12 e 24 horas, surge uma área de tecido isquêmico, circundada por um halo vermelho e zona pálidas, denominada placa marmórea. Com o decorrer do tempo, a lesão necrótica adquire coloração violácea e um nítido espalhamento gravitacional, aumenta ainda mais a área de necrose tecidual (FIGURA 5A e 5B). A agressão causada ao acidentado pode produzir ferimentos por longos períodos de tempo, com ulcerações cutâneas persistentes (FUTREL, 1992; da SILVA *et al.*, 2004).

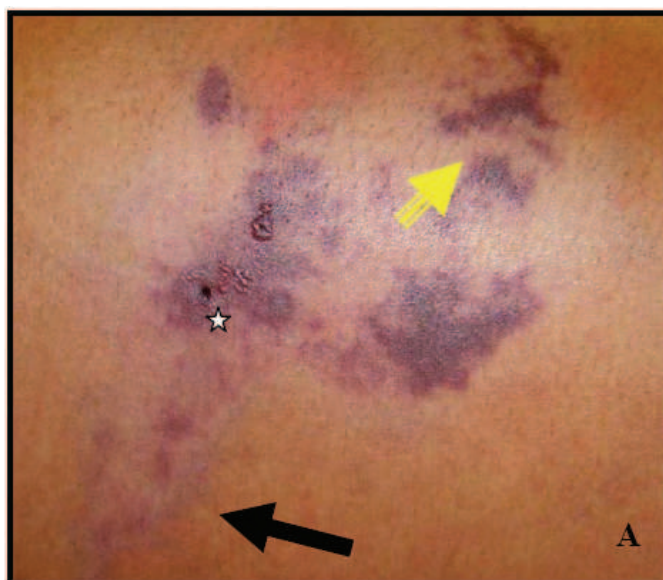


FIGURA 4 - LESÃO DERMONECRÓTICA. Na estrela branca o local da picada. Na seta preta a marca característica da picada de *Loxosceles*: o espalhamento gravitacional. Na seta amarela equimoses desenvolvidas ao redor da picada ADAPTADO DE: de SOUZA *et al.* (2008).

Entre 3 e 7 dias, forma-se uma ferida rígida que, ao longo do tempo e em alguns casos, pode expor uma escara de difícil cicatrização (FIGURA 5C e 5D) necessitando, muitas vezes, de cirurgia plástica reparadora para remoção do tecido necrosado e substituição por enxerto (WASSERMAN; ANDERSON, 1983). Esta lesão pode ter como agente sinérgico, acentuando sua gravidade, a presença de microorganismos provenientes das quelíceras, que no momento da picada são injetados concomitantemente com o veneno (MONTEIRO *et al.*, 2002).

Os dados clínicos e histopatológicos de biópsias da pele de pacientes que sofreram acidentes loxoscélicos mostram intenso infiltrado inflamatório, trombose, hemorragia, dermatite, endurecimento da região lesionada, eritema e necrose

liquefativa da derme e epiderme (FUTRELL, 1992; YIANNIAS; WINKELMANN, 1992; da SILVA *et al.*, 2004).

Achados histopatológicos do efeito do veneno de *L. intermedia* em coelhos foram muito bem descritos por Ospedal e colaboradores, (2002). Nas primeiras horas já são observados efeitos como edema, grande presença de leucócitos e deposição intravascular de rede de fibrina com o surgimento de trombos. Em 12 horas constata-se a desorganização das células da derme e infiltração leucocitária nas fibras de músculo esquelético. A partir de 24 horas ocorre desorganização das fibras de colágeno, destruição de vasos sanguíneos e necrose dérmica e muscular (OSPEDAL *et al.*, 2002).



FIGURA 5 - LESÃO DERMONECRÓTICA DE DIFÍCIL CICATRIZAÇÃO (A) Paciente de 6 anos com lesão cutânea típica de acidente loxoscélico. (B) Detalhe da placa marmórea após 36 horas do acidente. (C) Escara necrótica após 8 dias de evolução. (D) Cicatriz com quelóide após 3 meses do acidente. ADAPTADO DE: CABRERIZO *et al.* (2009).

Acidentes causados por *L. reclusa* podem também causar uma extensiva necrose tecidual no local da picada. Através de histologia de pele de coelho após inoculação do veneno desta espécie, foi observado que eosinófilos podem possuir um papel no dano tecidual após o envenenamento, contribuindo provavelmente para o processo inflamatório. O estudo encontrou um massivo infiltrado de eosinófilos perto do local da lesão (ELSTON, 2000).

A ação do veneno como um ativador de células endoteliais, estimulando a liberação de moléculas pró-inflamatórias e a adesão de polimorfonucleares, leva a uma resposta inflamatória descontrolada que contribui nas lesões dermonecroticas (PATEL *et al.*, 1994). É intrigante o estudo de Sunderkotter e colaboradores (2001), no qual, camundongos expostos ao veneno de aranha marrom (injeção intradérmica) não desenvolvem lesão dermonecrotica macroscópica; embora, entre 4 a 6 horas da inoculação, também apresentem alterações histológicas como infiltrado de células inflamatórias, edema na derme e alterações na integridade dos vasos sanguíneos (SUNDERKOTTER *et al.*, 2001).

### 3.3.2 Loxoscelismo sistêmico

Algumas vítimas podem desenvolver a forma mais grave de loxoscelismo, que corresponde ao quadro cutâneo-visceral ou sistêmico. O loxoscelismo sistêmico severo é raro, no entanto, em alguns casos, o comprometimento sistêmico pode ser a causa de morte, geralmente quando associado a complicações hematológicas e renais (da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005; de SOUZA *et al.*, 2008).

Os sintomas sugestivos desse quadro são astenia, episódios eméticos, alterações sensoriais, cefaléias, obnubação, convulsões e coma. Pode haver também *rash* cutâneo, prurido generalizado e petéquias (FUTRELL, 1992; BRAVO *et al.*, 1993). Nos casos mais graves, as alterações no quadro hematológico incluem anemia hemolítica, trombocitopenia decorrente da agregação plaquetária e coagulação intravascular disseminada (WASSERMAN; ANDERSON, 1983; da SILVA *et al.*, 2004). A insuficiência renal aguda também é uma grave complicação do quadro sistêmico, caracterizada por hematúria e hemoglobinúria, muitas vezes refletindo as desordens hematológicas. Em 62% dos casos de loxoscelismo sistêmico, há comprometimento da função renal (SCHENONE *et al.*, 1989).

O quadro de injúria renal foi descrito como sendo resultado dos distúrbios da hemostase e da reação inflamatória exacerbada em resposta ao veneno, porém, mais recentemente, pode-se constatar que componentes do veneno podem ligar-se diretamente a estruturas renais. Foi demonstrada a ação direta sobre tecido renal de uma isoforma da enzima fosfolipase D. A enzima foi capaz de provocar alterações na estrutura renal semelhantes às aquelas causadas pelo veneno total, ligando-se às células renais, com efeito citotóxico dependente de sua atividade catalítica

(TAMBOURGI *et al.*, 1998; CHAIM *et al.*, 2006; KUSMA *et al.*, 2008).

Quadros sistêmicos que vêm sendo melhor documentados recentemente é o desenvolvimento após picada de *L. reclusa* e *L. rufescens* de *rash* cutâneo ou exantema generalizado. O qual se caracteriza pelo aparecimento de pústulas de água estéreis sobre uma pele eritematosa acompanhado geralmente de febre e leucocitose. Embora seja de ocorrência incomum, Robb e colaboradores (2007) destacam que reações sistêmicas a partir do envenenamento podem ser fatais e o loxoscelismo deveria ter atenção em pacientes que apresentam o quadro exantemático generalizado (DONEPUDI *et al.*, 2005; ROBB *et al.*, 2007; MAKRIS *et al.*, 2009; PIPPIRS *et al.*, 2009).

### 3.3.3 Diagnóstico e Tratamento do Loxoscelismo

O diagnóstico de picadas de aranhas do gênero *Loxosceles* geralmente é feito baseado nos sintomas apresentados pelo paciente e pela evolução da lesão, uma vez que frequentemente a aranha não é capturada. Ainda não existem ensaios laboratoriais disponíveis comercialmente para diagnóstico de envenenamento por *Loxosceles*. Portanto, parâmetros laboratoriais como hemoglobínúria, hemoglobina sérica, bilirrubina indireta, creatina quinase, entre outros, são essenciais para o diagnóstico e avaliação da severidade do envenenamento (HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004).

O diagnóstico precoce da picada de aranha marrom abre caminho para evitar o desenvolvimento da lesão, porém, após certa evolução da dermonecrose, o tratamento é apenas sintomático (APPEL *et al.*, 2005; SWANSON; VETTER, 2006).

O tratamento é um fator preocupante, em virtude da dificuldade de diagnóstico e do desenvolvimento de quadro clínico semelhante a outras condições patológicas (PAULI *et al.*, 2006). Além do mais, um protocolo ou uma terapia definitiva não estão estabelecidos (SWANSON; VETTER, 2006).

Diversos tratamentos são descritos para o loxoscelismo (TABELA 1). O tratamento clássico inclui a administração de ácido acetilsalicílico, dapsona e outros antibióticos. Apesar de seus efeitos adversos, a administração precoce de dapsona pode reduzir a dor e o desenvolvimento da lesão dermonecrótica, pois atua como um inibidor da degranulação de polimorfonucleares. Apesar dos diversos estudos, a eficácia terapêutica da dapsona no tratamento do loxoscelismo não é certa. O papel

imunossupressor dos corticóides teria importância fundamental na redução da resposta imune exacerbada gerada pelo envenenamento. Quando a aranha é identificada como sendo *L. intermedia* ou *L. laeta* deve-se iniciar o tratamento com prednisona, mesmo sem a existência de uma lesão aparente (da SILVA *et al.*, 2004; HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004).

No Brasil estão disponíveis dois tipos de soro: antiloxoscélico (antivenenos de *L. intermedia*, *L. gaucha* e *L. laeta*) e antiaracnídico (antivenenos de aranha e escorpiões: *L. gaucha*, *Phoneutria nigriventer*, *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis*) (PAULI *et al.*, 2006).

A utilização do soro, muitas vezes combinado com corticóides ou dapsona, aparenta ser segura, sendo que são verificadas reações anafiláticas leves em apenas 20% dos casos (MÁLAQUE *et al.*, 2002). Enquanto no Paraná o soro só é utilizado nas primeiras 24 horas e em casos considerados moderados e graves (TABELA 1), em São Paulo o soro é utilizado em 70% dos casos. O grande problema na administração do soro antiveneno é a demora do paciente em procurar auxílio médico, uma vez que a picada não é percebida de imediato e a eficácia do soro é tempo-dependente. Muitas vezes o paciente procura atendimento médico entre 24 e 72 horas após a picada, quando os sintomas locais já estão instalados e, muitas vezes, em estado avançado (PAULI *et al.*, 2006).

TABELA 1 - MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DOS ACIDENTES POR *Loxosceles* E SEUS RESPECTIVOS TRATAMENTOS

<i>Classificação</i>	<i>Manifestações Clínicas</i>	<i>Tratamento</i>
<b><i>Leve</i></b>	Lesão incaracterística, (sendo a <i>Loxosceles</i> identificada como causador do acidente), lesão local sugestiva, sem comprometimento do estado geral e sem alterações laboratoriais.	Sintomáticos: Analgésico, Antiinflamatório local e Acompanhamento até 72 h após picada
<b><i>Moderado</i></b>	Com ou sem identificação da <i>Loxosceles</i> no momento da picada, lesão sugestiva com <i>rash</i> cutâneo ou lesão característica < 3cm de diâmetro, com ou sem alterações sistêmicas e sem alterações laboratoriais, sugestivas de hemólise.	Prednisona (5 dias): Adultos 40 mg/dia e Crianças 1 mg/kg/dia SAAr ou SALox IV 5 ampolas
<b><i>Grave</i></b>	Lesão característica de instalação rápida (primeiras 36 h), com >3 cm de diâmetro, evidência de hemólise (palidez, anemia aguda, icterícia) confirmada laboratorialmente.	SAAr ou SALox IV: 5 ampolas (forma cutânea), 10 ampolas (forma cutâneo-visceral), Prednisona (7 a 10 dias): Adultos 40 mg/dia e Crianças 1 mg/kg/dia

FONTE: BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos (2001) NOTA: SALox = Soro Antiloxoscélico; SAAr = Soro Antiaracnídico



Alguns autores descrevem a possibilidade do uso de Tetraciclina tópica para o tratamento e neutralização da lesão dermonecrotica causada pela picada de aranha marrom. A Tetraciclina agiria ligando metais divalentes e inibindo a ação de metaloproteases endógenas cuja expressão seria estimulada pela ação do veneno sobre a pele (KING, 2007; CAVALCANTE, 2007). A utilização de antibióticos também é indicada para prevenção de infecções secundárias (HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004).

Alguns autores sugerem o uso de anti-histamínicos para o tratamento do loxoscelismo, apesar da eficácia no tratamento ser controversa (ANDERSON, 1997; WENDELL, 2003). Enquanto a administração tópica de anti-histamínicos parece ineficaz, o uso parenteral do medicamento foi relacionado com a atenuação das manifestações cutâneas 12 horas após o início do tratamento (SCHENONE, 2003; YIGIT *et al.*, 2008).

#### 3.4 COMPOSIÇÃO DOS VENENOS LOXOSCÉLICOS E MECANISMOS MOLECULARES DE AÇÃO DESTES

O veneno de *Loxosceles* é um líquido cristalino e incolor, de natureza essencialmente protéica, produzido por um par de glândulas situadas no cefalotórax, ligadas a um par de quelíceras (dos SANTOS *et al.*, 2000). É composto basicamente por enzimas e moléculas biologicamente ativas. No veneno são encontradas proteínas de alta massa molecular pouco expressas e um grande conteúdo de proteínas de baixa massa molecular. Os venenos das espécies *L. laeta*, *L. intermedia* e *L. reclusa* possuem o mesmo perfil eletroforético, apresentando as principais bandas entre 30 e 35 kDa. A quantidade de veneno produzida é variável entre as espécies de aranha marrom, pelo tamanho e sexo do animal, entre outros fatores (de OLIVEIRA *et al.*, 2005).

O conteúdo total do veneno ainda não é totalmente esclarecido, sabe-se que além da grande quantidade de proteínas, a mistura também é constituída por ácidos nucléicos, aminoácidos livres, poliaminas neurotóxicas, monoaminas e sais inorgânicos (ESCOUBAS *et al.*, 2000). Pode ser comparado a alguns venenos de serpentes que demonstram abundância de enzimas na sua composição (da SILVEIRA *et al.*, 2002).

É consenso o fato da toxicidade do veneno da aranha marrom ser decorrente

do efeito combinado ou sinérgico de seus constituintes (GEREN *et al.*, 1973, GEREN *et al.*, 1976). Diversos autores destacam o papel da histamina e mastócitos em eventos inflamatórios, causando vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e infiltração de neutrófilos. Assim, os eventos inflamatórios iniciais provocados pelo veneno de aranha marrom poderiam estar relacionados com o conteúdo de histamina no veneno e degranulação de mastócitos (RATTMANN *et al.*, 2008; PALUDO *et al.*, 2009).

Várias toxinas com atividade enzimática vêm sendo descritas em venenos de diferentes espécies de *Loxosceles*, entre as quais se pode destacar enzimas como fosfatase alcalina, 5' ribonucleotídeo fosfohidrolase, serinoproteases, metaloproteases, hialuronidases e fosfolipases D (FEITOSA *et al.*, 1998, FUTRELL, 1992, VEIGA *et al.*, 2000a; da SILVA *et al.*, 2004; de CASTRO *et al.*, 2004).

Dos componentes presentes no veneno de *L. intermedia*, as proteínas melhor caracterizadas são as pertencentes à família de toxinas dermonecróticas ou família *Loxtox*. São enzimas do tipo fosfolipase D, e estão envolvidas com os efeitos mais tóxicos do veneno. Sejam as de origem do veneno bruto ou as obtidas através de técnicas de biologia molecular, estas toxinas são capazes de induzir experimentalmente dermonecrose, resposta inflamatória, agregação plaquetária, hemólise, aumento da permeabilidade vascular, nefrotoxicidade, letalidade em camundongos e efeitos citotóxicos em linhagens celulares estabelecidas (FUTRELL, 1992; da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005; CHAIM *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2007b; RIBEIRO *et al.*, 2007; APPEL *et al.*, 2008).

O mecanismo de ação das fosfolipases ainda não foi totalmente esclarecido, mas acredita-se que a hidrólise de lipídios, gerando mediadores como ceramida-1-fosfato e ácido lisofosfatídico, possa ativar determinadas vias de sinalização causando alterações fisiopatológicas e os efeitos deletérios destas toxinas (KUSMA *et al.*, 2008; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009).

Quanto às metaloproteases, foram caracterizadas como sendo moléculas de baixa massa molecular com atividade fibronectinolítica e fibrinogenolítica (20-28 kDa) e gelatinolítica (32-35 kDa). Foram primeiramente descritas no veneno de *L. intermedia* e posteriormente nos venenos de *L. laeta*, *L. gaucha* e *L. rufescens*. A atividade destas está possivelmente relacionada a distúrbios hemostáticos tais como hemorragia da derme e injúria de vasos sanguíneos (da SILVEIRA; WILLE *et al.*, 2007; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008)



São descritas na literatura duas serinoproteases (85 e 95 kDa) com atividade gelatinolítica, possivelmente relacionadas com a atividade tóxica do veneno de *L. intermedia*. Estas proteases degradando proteínas da matriz extracelular ou de membranas basais podem estar envolvidas também com distúrbios hemorrágicos, agravamento da lesão dermonecrotica e aumento da permeabilidade vascular (da SILVA *et al.*, 2004; da SILVEIRA; CHAIM *et al.*, 2007).

Outras enzimas caracterizadas nos venenos loxoscélicos que exibem ação sobre componentes da matriz extracelular são as hialuronidases. Acredita-se que estas enzimas atuem degradando glicosaminoglicanos e funcionem como um fator de espalhamento do veneno, contribuindo para sua toxicidade (BARBARO *et al.*, 2005; da SILVEIRA; CHAIM *et al.*, 2007).

### 3.5 HIALURONIDASES

A descoberta das hialuronidases foi através da observação que extratos de testículos e outros tecidos continham um “fator de espalhamento” o qual facilitava a difusão de corantes e vacinas antivirais aplicadas subcutâneamente (DURAN-REYNALS, 1928; CHAIN; DUTHIE, 1940). As hialuronidases são um grupo de enzimas que medeiam a degradação do ácido hialurônico, aumentam a permeabilidade de tecidos conjuntivos e decrescem a viscosidade dos fluidos corporais. São distribuídas através de todo o reino animal e expressas tanto em procariotos quanto eucariotos. Karl Meyer (1971) foi quem primeiro utilizou o termo hialuronidase. Em seu estudo, Meyer classificou-as em três diferentes grupos (FIGURA 6) baseados na análise bioquímica dos produtos finais gerados (MEYER, 1971).

Hialuronidases de mamíferos são endo- $\beta$ -N-acetilhexosaminidases e randomicamente clivam ligações glicosídicas  $\beta$ 1-4 em ácido hialurônico, condroitin e condroitin sulfato produzindo principalmente tetra e hexassacarídeos com N-acetilglucosamina no terminal redutor. Enzimas desta classe têm atividade hidrolítica e transglicosidase. Estão presentes em espermatozóides de mamíferos, lisossomos, venenos de serpentes, répteis e himenópteros (CRAMER *et al.*, 1994).

Hialuronato-3-glicanohidrolases são endo- $\beta$ -D-glucuronidases que clivam as ligações glucuronato no ácido hialurônico e são inertes a outros glicosaminoglicanos (GAGs). Da mesma forma, os principais produtos gerados são tetra e

hexassacarídeos, porém, com ácido glucurônico na porção redutora do produto. Esta classe inclui enzimas presentes nas glândulas salivares de sanguessugas e ancilostomídeos (HOTEZ *et al.*, 1992).

Têm-se também as hialuronidases microbianas que clivam o ácido hialurônico na ligação glicosídica  $\beta$ 1-4 usando  $\beta$ -eliminação e produzindo oligossacarídeos  $\Delta$ 4-5 insaturados. Diferente das outras, não utilizam hidrólise em sua atividade. Incluem ácido hialurônico liases de *Streptococcus pneumoniae* e *S. agalactiae* (KREIL, 1995; GIRISH; KEMPARAJU, 2007).

Além disso, hialuronidases são livremente classificadas em dois grupos baseados em seu perfil de atividade pH dependente. As hialuronidases com atividade em ambiente ácido são enzimas que estão ativas em pH entre 3 e 4. Este grupo inclui, por exemplo, enzimas séricas e do fígado humano. Hialuronidases com atividade em ambiente neutro são as que possuem atividade entre os pHs 5 e 8. Este grupo tem como exemplo as enzimas de serpentes, de esperma de mamíferos e veneno de abelhas (KREIL, 1995; STERN, 2004; KEMPARAJU; GIRISH, 2006).

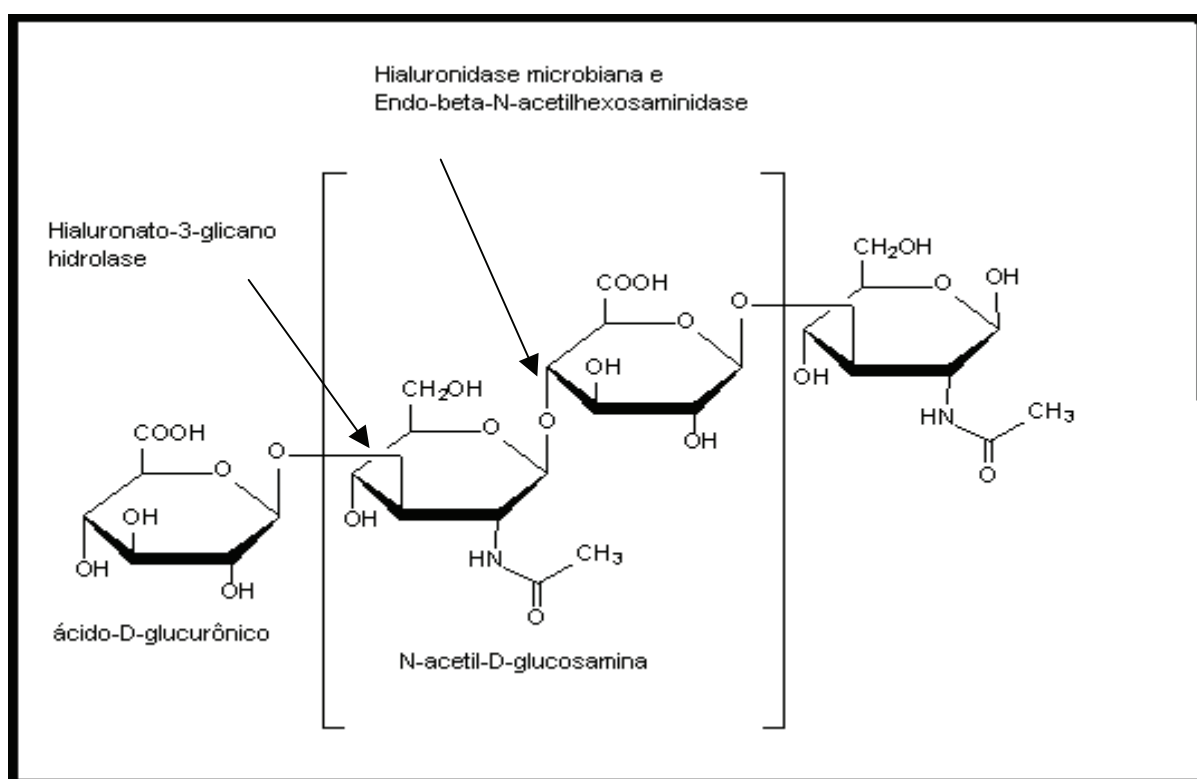


FIGURA 6 - PONTOS DE CLIVAGEM DE HIALURONIDASES EM ÁCIDO HIALURÔNICO.

ADAPTADO DE: da SILVEIRA *et.al.* (2007)

Hialuronidases de lagartos, escorpiões, aranhas, lagartas e vespas têm sido

isoladas (TABELA 2) e caracterizadas (KEMPARAJU; GIRISH, 2006). A respeito disso, enzimas do veneno de abelhas têm sido exaustivamente pesquisadas. A hialuronidase do veneno de *Apis mellifera* foi a primeira hialuronidase eucariótica clonada via cDNA por parte da sequência obtida por seqüenciamento N-terminal. A expressão do cDNA clonado em *Escherichia coli* resultou em um polipeptídeo com atividade hialuronidásica (GMACHL; KREIL, 1993).

Markovic-Housley e colaboradores (2000) co-cristalizaram hialuronidase de abelha com tetrâmero de ácido hialurônico. A análise da estrutura do cristal revelou que o sítio de ligação a ácido hialurônico é situado na porção final C-terminal de um barril  $\beta$  e é composto de muitos aminoácidos conservados. A estrutura do complexo fortemente sugere um mecanismo catalítico ácido-base, com Glutamina (Glu) 113 agindo como doador de próton e grupos N-acetil-carboxil do ácido hialurônico agindo como bases nucleofílicas.

TABELA 2 - PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E BIOFÍSICAS DE HIALURONIDASES DE VENENOS ANIMAIS

<b>Veneno</b>	<b>Massa Molecular (KDa)</b>	<b>pI</b>	<b>pH ótimo</b>	<b>Temperatura ótima</b>
<i>Agkistrodon acutus</i>	33	10.3	5	37
<i>Agkistrodon contortrix contortrix</i>	59.2	9	6	37
<i>Naja naja</i>	70.4	9.2	5	37
isoformas <i>N. naja</i>	52	9.7	5	37
<i>Ainsliaea fulvipes</i>	82	ND	4	30
<i>Tityus serrulatus</i>	51	ND	6	40
<i>Apis mellifera</i>	41	9	6	37
<i>Synanceia horrida</i>	62	9.2	6	37
<i>Heloderma horridum horridum</i>	63	5.1	5	Sensível
<i>Loxosceles obliqua</i>	49	ND	6-7	37
isoformas <i>L. obliqua</i>	53	ND	6-7	37
<i>Loxosceles reclusa</i>	33	ND	5-6.6	37
isoformas <i>L. reclusa</i>	63	ND	5-6.6	37
<i>Dolichovespula maculata</i>	39	ND	5-6	37
<i>Vespula germanica</i>	42	ND	5-6	37
<i>Centruroides limpidus limpidus</i>	47.5	ND	5-6	37
<i>Vespula vulgaris</i>	43	ND	5-6	37
<i>Palamneus gravimanus</i>	52	ND	4.5	37

FONTE: ADAPTADO DE: GIRISH; KEMPARAJU (2007)

NOTA: ND=Não Determinado.

Estas enzimas são também encontradas em venenos de serpentes, originalmente sabido como “fator gravitacional”, mas não têm sido bem estudadas

por ser uma enzima de pequena fração no veneno. Recentemente foi reportada a purificação de duas isoformas de hialuronidases presentes no veneno da cobra indiana *Naja naja* (GIRISH *et al.*, 2004b; GIRISH; KEMPARAJU, 2005a).

Kaiser (1956) foi o primeiro a relatar atividade de hialuronidase em venenos das aranhas brasileiras *Lycosa raptorial* e *Ctenus nigriventer*, atualmente conhecida como *Phoneutria nigriventer* (NAGARAJU; DEVARAJA; KEMPARAJU, 2007). A primeira descrição de hialuronidases em veneno de aranha marrom, foi em 1973, como toxinas de 33kDa e 63kDa no veneno de *L. reclusa* (WRIGHT *et al.*, 1973). Têm sido também descritas nos venenos de *L. rufescens*, como uma toxina de 32,5 kDa (YOUNG; PINCUS, 2001) e nos venenos de *L. reclusa*, *L. deserta*, *L. gaucho*, *L. laeta* e *L. intermedia* (BARBARO *et al.*, 2005).

Em estudos mais recentes com o veneno de *L. intermedia* foi detectada a degradação de ácido hialurônico e condroitin-sulfato. Experimentos de zimografia demonstraram atividade lítica em 41 e 43KDa. Com o uso de reações colorimétricas foi observado que a hidrolase deste veneno é uma endo- $\beta$ -N-acetil-D-hexosaminidase e análises em microscopia confocal de imunofluorescência da derme de coelho confirmaram a redução da detecção de ácido hialurônico intacto das biópsias após a exposição ao veneno (da SILVEIRA *et al.*, 2007).

A respeito da longa história de mais de cinco décadas de hialuronidases em veneno de aranhas e praticamente nenhum estudo de isolamento e caracterização destas até o presente deve decorrer do fato da existência em quantidades diminutas destas enzimas nestes venenos (NAGARAJU; DEVARAJA; KEMPARAJU, 2007).

### 3.5.1 Aplicações médicas e biotecnológicas

Pela clivagem de ácido hialurônico nos tecidos, hialuronidases aumentam a permeabilidade de membrana, reduzem a viscosidade e deixam os tecidos mais permeáveis a fluídos injetáveis. Portanto, estas enzimas podem ser usadas terapeuticamente para aumentar a velocidade de absorção de compostos, para promover a reabsorção de excesso de fluídos, aumentar a efetividade de anestésias locais e diminuir a destruição tecidual por injeções subcutâneas e intramusculares, por exemplo, nos casos de nutrição parenteral e quimioterápicos (FROST *et al.*, 1996; FARR *et al.*, 1997).

Hialuronidases podem ser usadas para diminuir a extensão de infartos do miocárdio, como têm sido demonstrados em estudos biomédicos em animais. A administração combinada de hialuronidase e uroquinase em ratos com infarto do miocárdio diminui significativamente a taxa de mortalidade de 25%, em ratos tratados apenas com uroquinase, para 12,5% em ratos tratados com a combinação de enzimas em doses adequadas (MUCKENSCHNABEL *et al.*, 1997).

Hialuronidases são amplamente usadas em muitos campos incluindo ortopedia, cirúrgico, oftalmologia, medicina interna, oncologia, ginecologia e dermatologia. As hidrolases proveniente de esperma desempenham um importante papel no sucesso das fertilizações de mamíferos, incluindo humanos (PRIMAKOFF *et al.*, 1985; BORRELLI *et al.*, 1986; MANZEL e FARR, 1988; FROST *et al.*, 1996; LIN *et al.*, 1994; KLOCKER *et al.*, 1995). Existem evidências que hialuronidases possuam efeitos antitumorais intrínsecos. Foi relatado que tratamento com hialuronidases bloqueia invasão de linfonodos por células tumorais em modelo animal de linfoma de células T (ZAHALKA *et al.*, 1995).

### 3.5.2 Envolvimento fisio-patológico da atividade de hialuronidases

Hialuronidases têm sido relacionadas em um número de processos fisiológicos e patológicos como embriogênese, angiogênese, inflamação, cicatrização de feridas, patogênese microbiana e difusão sistêmica de toxinas de venenos. Portanto, identificação e caracterização de inibidores de hialuronidases podem ser valiosos para o desenvolvimento de contraceptivos, agentes antitumorais, antivenenos e antimicrobianos (MIO; STERN, 2002; KHANUM *et al.*, 2005; SALMEN *et al.*, 2005; GIRISH; KEMPARAJU, 2005a,b; ISOYAMA *et al.*, 2006; MACHIAH *et al.*, 2006).

Inibidores de hialuronidases são potentes agentes regulatórios ubíquos, os quais estão envolvidos na manutenção do balanço entre o anabolismo e catabolismo do ácido hialurônico. Em geral, inibidores de hialuronidases pertencem a diferentes classes químicas (TABELA 3) como proteínas, GAGs, polissacarídeos, componentes bioativos derivados de plantas e compostos orgânicos sintéticos (GIRISH; KEMPARAJU, 2007).

TABELA 3 - DIFERENTES CLASSES DE INIBIDORES DE HIALURONIDASES

<i>Tipo do composto</i>	<i>Composto</i>	<i>Fonte da hialuronidase</i>
Alcalóide	Ácido aristolóquico, reserpina	Veneno de cobra
Antioxidante	Ácido ascórbico, NDGA, BHT, curcumina, ácido tânico	Veneno de cobra, microbiana
Drogas anti-inflamatórias	Dexametasona, indometacina, cromoglicato, saliciatos	Veneno de cobra, microbiana e testicular
Flavonóides/Terpenóides	Flavona, fenoprofeno, quercitina, triterpenos, rutina, glicirizina	Veneno de cobra, microbiana e testicular
Compostos sintéticos	PS <sub>53</sub> , hesperidina fosforilada, derivados de L-arginina, derivados indólicos	Veneno de cobra, testicular, Hyal-1
GAGs e glicosídeos	Heparina, heparan, dermatan e condroitin sulfato, HA-O-sulfatado,	Veneno de cobra, veneno de abelha, soro humano e testicular
Ácidos graxos	Saturados (C <sub>10:0</sub> a C <sub>22:0</sub> ), Cis-insaturados C <sub>14:1</sub> a C <sub>24:1</sub>	Microbiana e testicular
Poli e oligossacarídeos	Quitosana, Dextran sulfato, derivados da plantatose, verbascose, lanotanóides	Veneno de cobra, veneno de abelha, testicular, HA lyase
Outras proteínas	WSG, inibidor de hialuronidase sérica	Veneno de cobra, veneno de abelha, testicular, Hyal-1
Outros reagentes	HCN, L-arginina, L-NAME, guanidina hidrocloreídrica	HA lyase

FONTE: ADAPTADO DE: GIRISH; KEMPARAJU (2007)

NOTA: HA = ácido hialurônico; PS<sub>53</sub> = Polímero de ácido formaldeído hidroquinona sulfônico; NDGA = nordidroguaiaracético; BHT = butilidroxitolueno; HCN = ácido cianídrico; L-NAME = nitro-L-arginina metil éster

Além do exposto, hialuronidases são relatadas ser “fatores alergênicos” de veneno de escorpiões, abelhas e vespas. Podendo induzir sérias e fatais reações anafiláticas mediadas por IgE em humanos (LU *et al.*, 1995; KOLARICH *et al.*, 2005). O conhecimento de determinantes estruturais responsáveis por este potencial alérgico é esperado ter implicações clínicas. As estruturas de alérgenos de veneno de insetos têm sido estudadas intensivamente desde a metade dos anos de 1970 (HOFFMAN, 2008). Além de hialuronidases outras toxinas dentro dos venenos são relatadas participarem de reações de hipersensibilidade (PADAVATANN *et al.*, 2007; PEIREN *et al.*, 2006).

### 3.6 ALERGIA

Uma substância que é capaz de provocar uma resposta imune é denominada

imunógena. Quando esta é capaz de induzir respostas com produção de anticorpo tipo Imunoglobulina E (IgE) é então, denominada alérgeno. Uma pessoa é dita ser alérgica ou hipersensível quando reage a fatores alergênicos (ARLIAN, 2002).

Alérgenos podem induzir reações de hipersensibilidade por diversas vias: ao ser inalado, injetado, ingerido ou absorvidos através da pele e mucosas. Geralmente estes fatores são proteínas ou moléculas com uma grande porção protéica (glicoproteínas). Porém, carboidratos ou componentes polissacarídeos também podem desencadear respostas do sistema imune (GALLI; TSAI; PILIPONSKY, 2008; ARLIAN, 2002).

O termo alergia foi inserido por Pirquet (1906) para chamar a atenção para a propensão de alguns indivíduos desenvolverem sinais e sintomas de hipersensibilidade quando expostos a determinadas substâncias inócuas à maioria. Doenças alérgicas são uma desordem comum, atingindo 40% da população mundial (JOHANSSON, 2000). Os sintomas clínicos são gerais e incluem edema, prurido, eritema e *rash* cutâneo (BONIFAZI, 2005).

A porção do alérgeno reconhecida por um anticorpo, o epítipo, usualmente é pequena: 8-15 resíduos de aminoácidos são reconhecidos pelo receptor de célula T (*TCR*) e pelo complexo maior de histocompatibilidade (*MHC*). Estes resíduos podem ser sequenciais ou conformacionais. IgE geralmente apenas reconhece alérgenos conformacionais e células do sistema imune, como linfócitos T e B, são epítipo-específicas (ARLIAN, 2002).

A reação inicial, do indivíduo sensibilizado, que ocorre dentro de minutos é chamada de hipersensibilidade imediata ou tipo I. Citocinas liberadas durante esta fase podem desenvolver uma resposta de fase tardia (4—48h) envolvendo infiltração e acúmulo de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, macrófagos e linfócitos. Estas células e seus produtos podem exacerbar a reação inicial. O infiltrado celular também é resultado da regulação de expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular em resposta a citocinas (GALLI; TSAI; PILIPONSKY, 2008).

A ligação do alérgeno ao *TCR* e co-receptores ativa ambas as células T e B. Linfócitos T auxiliares tipo 2 (*Th*<sub>2</sub>) possui um perfil característico de citocinas: IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, e IL-13. IL-4 e IL-13 são responsáveis pelo aumento da proliferação e diferenciação de células B em plasmócitos, os quais assim, irão produzir anticorpos tipo E e células B de memória (ARLIAN, 2002).

Mastócitos teciduais são as principais células efetoras das reações alérgicas,



mas basófilos provenientes da circulação também auxiliam no processo. Imunoglobulinas tipo E ligam por meio de sua porção *Fc* na superfície de ambas estas células. Exemplos de mediadores que são exocitados quando IgEs sofrem ligações cruzadas com alérgenos incluem histamina, condroitin sulfato, heparina, proteases (triptase, quimase, carboxipeptidase, catepsina), mediadores lipídicos (leucotrienos, tromboxanos, prostaglandinas) e uma variedade de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13); dependendo do tipo e subtipo celular (GALLI; TSAI; PILIPONSKY, 2008; CAUGHEY, 2007).

Reações alérgicas não mediadas por IgE existem mas os mecanismos são ainda pouco compreendidos (KANG *et al.*, 2001; MACDONALD *et al.*, 2001, ARLIAN, 2002).

### 3.6.1 Alérgenos em venenos animais

A nomenclatura de alérgenos caracterizados está padronizada e descrita por King (2005) e Larsen (2006) e seus respectivos colaboradores. De um modo resumido um alérgeno é descrito com as primeiras três letras do gênero, a primeira letra da espécie e um número arábico. É consenso que alérgenos que dividam propriedades bioquímicas, funções biológicas similares e possuam mais de 67% de identidade na sequência aminoacídica sejam atribuídos ao mesmo grupo.

Muitos alérgenos foram identificados em venenos de artrópodes como abelhas, vespas e formigas (BONIFAZI *et al.*, 2005). *Imunoblotting* do veneno da abelha doméstica *Apis mellifera* demonstrou que este contém 10 proteínas entre 8 e 52KDa que ligam IgE do soro de pacientes alérgicos ao veneno de abelha (JEEP *et al.*, 1996). O perfil de ligação de IgE varia entre pacientes. Existem 4 grupos de alérgenos no veneno desta espécie: Api m 1, Api m 2 (hialuronidase), Api m 3 e Api m 4 (HOFFMAN, 1977; KING *et al.*, 1995; YUNGINGER, 1998; KING; SPANGFORT, 2000). Dentre os alérgenos de *Dolichovespula maculata* se incluem fosfolipase A1, hialuronidase (Dol m 2) e antígeno 5 (Dol m 5). Pelo menos um destes três alérgenos tem sido identificado no veneno de mais de 14 espécies de vespas. *Solenopsis invicta* e *Solenopsis richteri* são espécies de formigas conhecidas por possuírem potentes alérgenos (NORDVALL *et al.*, 1988). Imunoreações revelaram a ligação de IgEs de soros humanos na região de 13 a 42KDa. Quatro destes (Sol i 1 – Sol i 4) foram isolados e purificados de *S. invicta* (HOFFMAN; DOVE; JACOBSON,



1988).

Durante os últimos anos um número de interessantes estudos tem aumentado nosso conhecimento sobre as estruturas primárias de proteínas alergênicas de veneno e saliva de insetos. Estruturas tridimensionais têm sido determinadas (TABELA 4) e tem nos ajudado a entender a reatividade cruzada entre os epítomos de carboidratos destas glicoproteínas (HOFFMAN, 2008).

TABELA 4 - ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS DE PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS DE VENENO DE INSETOS ACESSÍVEL ATRAVÉS DE ENTREZ

<b><i>Abelha (Apis melifera)</i></b>	
1 POC	Fosfolipase A1
2 MLT	Melitina
1 FCQ	Cristal monoclinico de hialuronidase
1 FCU	Cristal trigonal de hialuronidase
1 FCV	Complexo ácido hialurônico - hialuronidase
2 J88	Complexo anticorpo - hialuronidase
1 TER	Tertiapina
<b><i>Vespa (Vespula vulgaris)</i></b>	
1 QNX	Antígeno 5
2 ATM	Hialuronidase
<b><i>Vespa (Vespula lewissii)</i></b>	
1D7N	Mastoparan com detergente
<b><i>Vespa (Vespa xanthoptera)</i></b>	
1A13	Mastoparan ligado à proteína G
2CZP	Mastoparan ligado à membrana

FONTE: ADAPTADO DE: HOFFMAN (2008)

Têm sido relatadas reações desde hipersensibilidade à choque anafilático em veneno de serpentes e escorpiões, podendo ser um contribuinte dos casos fatais independentemente da toxicidade do veneno por ele mesmo. Porém, pouca informação é avaliável para os determinantes de tal sensibilidade (MORE, 2004; de MEDEIROS *et al.*, 2008)

#### 3.6.1.1 Aplicações médicas e biotecnológicas de alérgenos

Uma das conseqüências dos estudos de proteínas presentes no veneno de insetos tem sido a descoberta de família de proteínas de importância biológica em outros organismos. Proteínas semelhantes ao *Antigen 5* são muito importantes no desenvolvimento de parasitas helmínticos e um número de potenciais vacinas são baseadas nesta proteína (ARLIAN, 2002).

Nas últimas décadas o aumento da prevalência de doenças alérgicas tem sido paralelo a uma grande demanda nos seus diagnósticos e produtos terapêuticos. Em relação a isso, alérgenos recombinantes são esperados ser quantitativamente superior aos naturais em preparações usadas no diagnóstico *in vivo* e *in vitro*, bem como no tratamento das condições alérgicas. Um grande número de ferramentas de biologia molecular para produção de proteínas recombinantes ou alérgenos tem sido desenvolvido e a tecnologia de DNA recombinante é sem dúvida umas das mais avançadas. Com este sistema, proteínas podem ser modificadas, sua expressão controlada, influenciada e sua purificação é muitas vezes realizada em uma etapa (AALBERSE, 2000; BIRCHER, 2005; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008).

### 3.6.2 Eventos inflamatórios de venenos animais são dependentes da atividade de mastócitos

É sabido que mastócitos são críticos para o desenvolvimento de resposta inflamatória tecidual periférica (METCALFE *et al.*, 1997; MEKORI; METCALFE, 2000; ZUO *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2007). Muitos dos eventos inflamatórios são atribuídos à atividade da histamina e serotonina presentes nos grânulos citoplasmáticos destas células (CIRINO *et al.*, 1989; LANDUCCI *et al.*, 1998).

Histamina é comumente encontrada em venenos de artrópodes e substanciais quantidades tem sido detectada em venenos de aranhas. Por exemplo, na espécie *Lycosa godeffroyi* encontra-se a quantidade de 44,5 ng/μg de veneno total (RASH *et al.*, 1998), no veneno de *Lamplona cylindrata* 50 ng/μg de veneno extraído de machos (RASH *et al.*, 2000) e PALUDO e colaboradores (2009) detectaram 89ng/ μg no veneno de *L. intermedia*.

Aminas biogênicas, principalmente histamina, são bem conhecidas como os componentes no veneno de aranhas responsáveis pela produção de dor, por aumentar o fluxo sanguíneo e a permeabilidade capilar, facilitando dessa forma a distribuição do veneno (RASH; HODGSON, 2002). São, portanto, adjuvantes na toxicidade do veneno (KUHN-NENTWIG *et al.*, 1994).

O envolvimento da degranulação de mastócitos e liberação de histamina e serotonina tem sido relacionados ao edema e aumento da permeabilidade vascular nos venenos de *Bothrops jararaca* (TREBIEN; CALIXTO, 1989), *Vespula vulgaris*

(GRIESBACHER *et al.*, 1998), *Phoneutria nigriventer* (COSTA *et al.*, 2001) e do escorpião *Buthus martensi* (LIU *et al.*, 2007).

Trabalhos recentes em camundongos demonstram que a injeção subcutânea do veneno de *L. intermedia* causa um significativo aumento no edema e na permeabilidade vascular. É interessante notar que quando o veneno é submetido à diálise em membrana permeável a moléculas menores que 8kDa (como é o caso da histamina) e posteriormente aquecido, os dados de permeabilidade capilar e edema são semelhantes ao controle negativo, sugerindo que a conformação e atividade catalítica de proteínas constituintes deste veneno são importantes para o evento inflamatório desencadeado (da SILVEIRA *et al.*, 2006; PALUDO *et al.*, 2009).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 REAGENTES

Os sais, ácidos e compostos orgânicos utilizados foram adquiridos da Merck (Darmstad, Alemanha). O ágar-ágar,  $\beta$ -mercaptoetanol, marcadores de massa molecular protéicos foram adquiridos da Sigma (St. Louis, EUA). Da Promega (Madison, EUA) o brometo de etídio, o kit de miniprep e o kit pGEM-T foram adquiridos. A agarose, o IPTG e o Trizol, da Invitrogen (Carlsbad, EUA). Da empresa Fermentas (Burlington, Canadá) foram adquiridos os marcadores de massa molecular de DNA, X-Gal, enzimas *Pfu* e *Taq* polimerase, ligase, enzimas de restrição *XhoI*, *NdeI* e *BamHI* juntamente com os tampões necessários, além dos dNTPs, a enzima *CIAP* com o correspondente tampão. Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de *PCR* foram produzidos sob encomenda pela Bioneer (Daejeon, Coréia do Sul). Para o cultivo de bactérias foram utilizados no preparo dos meios triptona, extrato de levedura e ágar-ágar adquiridos da HiMedia (Mumbai, Índia). Os antibióticos ampicilina e cloranfenicol foram adquiridos da USB (Cleveland, EUA). As cepas bacterianas utilizadas durante o trabalho foram adquiridas das empresas Invitrogen (Carlsbad, EUA) e Novagen (Darmstadt, Alemanha). Da Invitrogen também foi adquirido o kit para as transcrições reversas ImPromII<sup>TM</sup> *Reverse Transcription System*. Da GibcoBRL (Bethesda, EUA) foram adquiridos Glicina, Tris, Acrilamida e bis-Acrilamida (para preparo da solução de poliacrilamida), TEMED e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). O corante Azul de Coomassie Brilhante R-250 foi adquirido da Amresco (Solon, EUA).

### 4.2 ANIMAIS

Para extração de veneno foram utilizadas aranhas adultas da espécie *Loxosceles intermedia* coletadas em Curitiba e Região Metropolitana e mantidas em condições apropriadas no Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos da Universidade Federal do Paraná.

### 4.3 EXTRAÇÃO DO VENENO POR ELETROCHOQUE

O veneno de *L. intermedia* foi obtido pela aplicação de eletrochoque de 15 V no cefalotórax da aranha e o veneno liberado coletado por capilaridade em micropipeta. Um *pool* do veneno de diferentes aranhas foi diluído com tampão PBS para uma concentração de 2 mg/mL e congelado a -20 °C (FEITOSA et. al, 1998).

#### 4.4 ELETROFORESE

##### 4.4.1 Eletroforese em agarose

As análises dos produtos de *PCRs* foram realizadas em gel de agarose 1,5% ou 2%, na qual a massa correspondente de agarose foi dissolvida em tampão TAE sob aquecimento, sem levantar fervura. Foi adicionado 0,5µg/ml de gel de brometo de etídio à solução.

##### 4.4.2 SDS-PAGE

Géis 12,5% foram preparados com a mistura de solução de acrilamida (acrilamida e bis-acrilamida), LGB (*Lower Gel Buffer*), água destilada e os catalisadores APS e TEMED.

#### 4.5 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DA GLÂNDULA PRODUTORA DE VENENO DE *Loxosceles intermedia*

O método utilizado foi o descrito por Chomezynski (1993). Foi extraído o RNA total de 100 glândulas de *L.intermedia* (5 dias após a coleta de veneno) com auxílio do reagente Trizol® e todo o material e demais reagentes livres de RNases. Utilizando isopropanol o RNA foi precipitado, sendo posteriormente lavado com isopropanol 75% e redissolvido com água DEPC tratada (água ultrapura homogeneizada com 0,1% DEPC por 2h e autoclavada por 45 minutos).

#### 4.6 QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA INTEGRIDADE DO RNA TOTAL EXTRAÍDO

Para saber a concentração do RNA extraído e a relação de ácido nucléico em relação à proteínas foi realizada a leitura nos comprimentos de onda 260nm e

280nm em espectrofotômetro (U-2001 *Espectrophotometer*). Para tal, foram utilizadas cubetas de quartzo tratadas por 15 minutos com solução metanol: ácido clorídrico (1:1). Alternativamente a dosagem foi realizada utilizando 1µL do RNA total em Nanodrop1000® (*ThermoScientific*).

Para saber a integridade do RNA extraído, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio (0,5µg/ml) em tampão TAE (Tris base 40mM, acetato 20mM, EDTA 1mM) e corrida eletroforética a 5V/cm de gel em cuba horizontal (com prévio tratamento de solução peróxido de hidrogênio 3% por 15 minutos). O gel foi visualizado e a imagem foi registrada com auxílio de aparelho de análise de imagens Chemidoc–XRS® e software Quantity One–SW® (*BioRad*)

## 4.7 TRANSCRIÇÃO REVERSA ACOPLADA À REAÇÃO DE CADEIA DA POLIMERASE

### 4.7.1 *Rapid Amplification of 5' cDNA End (5' - RACE)*

A técnica utilizada foi modificada de Sambrook e Russel (2001). Com o intuito de obter a porção 5' de um cDNA específico, o qual já se conhece parte da sequência, em um tubo PCR foi adicionado o volume equivalente a 1 µg (nas reações para o alérgeno e hialuronidase) ou 2µg de RNA total (em reações para hialuronidase); 0,2µM de oligonucleotídeo gene-específico antisense e água DEPC tratada qsp 10µl. Foi feita a desnaturação do RNA colocando este tubo por 5 minutos a 70°C e depois imediatamente no gelo. Neste foram adicionados tampão para transcriptase reversa (1X); MgCl<sub>2</sub> (2,5mM); dNTPs mix (A,T,C,G – 0.4mM) e inibidor de RNase (20U *Recombinant RNasin*®). A solução foi homogenizada por pipetagem. Acrescentou em seguida 200U de enzima transcriptase reversa *Improm-II*<sup>TM</sup> e a mistura foi levada ao termociclador *My Cyclor– Thermal Cyclor BioRad*® por 25°C/5min e 60min a 42°C. A reação foi interrompida a 70°C/15min e mantida a 4°C.

O cDNA foi seletivamente precipitado com acetato de amônio (2,5M) e etanol absoluto gelado (3v:1v de amostra). A mistura foi incubada a -20°C por meia hora. A centrifugação foi realizada a 4°C 20.000xg por 30 min. Depois de retirado o sobrenadante, o sedimento foi lavado com 750 µl de etanol 70% gelado e apenas dispensado sobre o sedimento. A centrifugação foi realizada na mesma rotação anterior por 5 minutos. Este *pellet* foi ressuspenso em água ultrapura estéril.

Adicionou-se tampão para Terminal desoxinucleotidil Transferase (TdT) (1X) e dATP (0,2 mM). A reação foi incubada por 2 min a 94 °C, colocada imediatamente em gelo e à ela foi adicionado 20U de TdT, incubado a 37 °C por 10 min. Inativou-se a enzima aquecendo a 65 °C por 10 min. No final desta etapa obteve-se um cDNA simples fita com cauda 3' homopolimérica de adenina.

Para a reação de *PCR* propriamente dita, utilizou-se 5µl do cDNA obtido na reação anterior; tampão para *Taq* DNA polimerase (1X); MgCl<sub>2</sub> (1,5mM); dNTPs mix (0,2mM); oligo(dT)<sub>17</sub>*adaptor* (5'- CGG TAC CAT GGA TCC TCG AGT T16- 3) (0,2µM); oligonucleotídeo gene-específico reverso (0,2 µM); *Taq* DNA polimerase (1,25U) para um volume final de reação de 50µl. Esta mistura foi incubada em termociclador: 94°C/2min (1 ciclo); 94°C/30s, 50°C/30s, 72°C/1min (35 ciclos); 72°C/10min (1 ciclo); 4°C/ infinito.

#### 4.7.2 *Rapid Amplification of 3' cDNA End (3' - RACE)*

Utilizando uma reação de transcrição reversa com o intuito de obter a sequência específica de um cDNA até a porção 3' foram feitas modificações segundo a técnica descrita em Sambrook e Russel (2001).

Em um tubo *PCR* foi adicionado o volume equivalente a 1 ou 2µg de RNA; 0,2µM de oligo(dT)<sub>17</sub>*adaptor* e água DEPC tratada qsp 10µl. Os volumes e concentrações dos reagentes adicionados para a reação de transcrição reversa, bem como para a precipitação do cDNA foram os mesmos descritos no tópico anterior. Para a reação de *PCR*, utilizou-se 5µl do cDNA obtido; tampão para *Taq* DNA polimerase (1X); MgCl<sub>2</sub> (1,5mM); dNTPs mix (0,2mM); oligonucleotídeo gene-específico sense (0,2µM); oligo(dT)*adaptor* (0,2 µM); *Taq* DNA polimerase (1,25U) para um volume final de reação de 50µl. Esta mistura foi incubada em termociclador: 94°C/2min (1 ciclo); 94°C/30s, 55°C/30s, 72°C/1min (35 ciclos); 72°C/10min (1 ciclo); 4°C/ infinito.

#### 4.8 EXTRAÇÃO DOS FRAGMENTOS DO GEL DE AGAROSE

O gel de agarose foi recortado com auxílio de bisturi no local de visualização das bandas correspondentes, colocado em eppendorfs previamente pesados e

extraído com auxílio de reagentes apropriados para extração de DNA em agarose (*Quick Gel Extraction Kit*, Eppendorf® e *Gel Band Purification kit*, GE®).

#### 4.9 LIGAÇÃO EM pGEM-T

O DNA amplificado foi diluído em água, dosado e o volume correspondente a 0,075pmol deste inserto foi colocado em tubo *PCR*. Adicionado 50ng do vetor pGEM-T (vetor A-T), tampão ligase (1X) e T4 DNA ligase (3U/ $\mu$ l). A temperatura de incubação foi padronizada para cada caso, variando de 4-16°C por 16h.

#### 4.10 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO

Uma alíquota de solução de bactéria DH5 $\alpha$  eletrocompetente foi descongelada e mantida em gelo adicionando 1 $\mu$ l da reação de ligação e eletroporando-a sob condições de 1.8kV, 25MF, 200 $\Omega$  em eletroporador *Gene Pulser X-Cell® BioRad*.

Estas bactérias foram colocadas em meio SOC (triptona 20g/l; extrato de levedura 5g/l; NaCl 0,5g/l; KCl 2,5mM; MgCl<sub>2</sub> 10mM, MgSO<sub>4</sub> 10mM, glicose 0,2M) a 37°C por 1 hora sobre agitação para adquirir resistência ao antibiótico específico e recuperarem suas membranas da alta voltagem.

#### 4.11 PLAQUEAMENTO DAS BACTÉRIAS TRANSFORMADAS

As bactérias recuperadas foram divididas em duas porções: uma de 100 $\mu$ l plaqueadas em meio LB-ágar (triptona 10g/l, extrato de levedura 5g/l, cloreto de sódio 10g/l, agar-ágar 15g/l) suplementado com ampicilina (100 $\mu$ g/ml) previamente tratadas com *IPTG* (100mM - 100 $\mu$ l) e *X-Gal* (20mg/ml - 40 $\mu$ l); e outra de 900 $\mu$ l que foi submetida a centrifugação e ressuspensa em 100 $\mu$ l de meio SOC para o plaqueamento. As placas com a suspensão bacteriana foram semeadas com alça de Gauss estéril até completa absorção do líquido na placa. As placas foram incubadas a 37°C em incubadora tipo BOD 411 D, Nova Ética por 16h.

#### 4.12 PCR DE COLÔNIA



Após observação das placas anteriormente citadas, foram escolhidas colônias incolores (supostamente com inserto), algumas azuis e outras parcialmente azuis para replaqueamento (*Master plate*) e confecção do *PCR* de colônia. Cada uma das colônias escolhidas foi tocada com auxílio de palito de madeira estéril, parte do material esfregado no fundo de um tubo de 0,2ml e outra parte tocada na *Master plate* numerada. Nos tubos foram acrescidos: Tampão *Taq* DNA polimerase (1X); dNTPs (0,2mM);  $MgCl_2$  (1,5mM); oligonucleotídeo sense universal T7 (0,2  $\mu$ M); oligonucleotídeo universal antisense T7 *terminator* ou SP6 (0,2 $\mu$ M) e *Taq* polimerase (1,25U/50 $\mu$ l). Esta mistura foi incubada em termociclador, para amplificação do inserto no seguinte protocolo: 95°C/5min (1ciclo); 95°C/30s – temperatura média das *Tms* dos primers diminuídos de 5°C/30s – 72°C/1min (35 ciclos); 72°C/10min (1 ciclo); 4°C/ infinito.

O produto do *PCR* de colônia foi analisado em gel de agarose 1,5% ou 2%. E o resultado foi visualizado e registrado em aparelho de captura de imagem *Chemidoc*®.

#### 4.13 MINI PREPARAÇÃO PLASMIDIAL

A partir da *Master plate* os clones escolhidos foram repicados com auxílio de pinça e palitos de madeira estéreis para um pré-inóculo em LB líquido com ampicilina (100 $\mu$ g/ml) e incubado por 16h a 37°C (em incubadora 430 RDB tipo *shaker* Nova Ética) em tubo de aeração. Cada cultura com crescimento saturado foi centrifugada (14000xg por 1min) a temperatura ambiente e se obteve um sedimento bacteriano consistente. De cada um dos centrifugados bacterianos foi feita a extração do plasmídeo com auxílio de reagentes de Miniprep da Promega (*Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems*®).

#### 4.14 REAÇÃO E ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO

Foi utilizado o protocolo de sequenciamento *Big Dye* com um volume total de reação de 10 $\mu$ l. Destes 4 $\mu$ l era o reagente *Big Dye* ou *Dye Namic* e os outros 6 $\mu$ l eram a somatória do volume de DNA molde, oligonucleotídeo e água estéril. A massa de plasmídeo utilizada dependia do tamanho do inserto, segundo *BigDye*® *Terminator v3.1Cycle Sequencing Kit*. Cada clone foi submetido à duas reações de

seqüenciamento, uma utilizando o iniciador universal sense e outra o iniciador universal antisense. Essas reações foram levadas em termociclador de placa à 95°C/20min - 50°C/15s - 60°C/1min (29ciclos); 4°C/ infinito. Existiram seqüenciamentos que foram submetidos com *primers* específicos, mas essas reações não foram usuais.

A precipitação foi realizada com acetato de amônio 7,5M e etanol absoluto. Deixando secar 16h em ambiente escuro. O produto foi ressuspenso em solução de corrida para a leitura em *MEGABACE DNA Analysis systems®* (Armstrong Biosciences) ou *ABI Prism 377*. O resultado do seqüenciamento foi analisado em *software Four Peaks*, o alinhamento das seqüências realizado através do *Clustalw* <<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>> e a sequência mais representativa analisada usando a ferramenta *BLAST* <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>.

#### 4.15 PCR COM *Pfu* DNA POLIMERASE

Com base nos resultados dos seqüenciamentos e depois de conseguir as seqüências do cDNA que codifica as toxinas por *Taq* DNA polimerase, uma enzima de processividade alta, mas, baixa fidelidade; foram desenhados iniciadores sense e antisense para a amplificação do cDNA específico de cada toxina. Foi realizado uma reação de transcrição reversa com oligo(dT)<sub>17</sub>*adaptor* nas condições descritas no tópico 3.6.1. Com o cDNA resultante, os *primers* específicos para a extremidade 5' (5'- CTA CTC TGG AAA GAC TTG GAA C – 3') e 3' (5'- GAA ACT TAC GGC AAC CTT CAT AGC – 3') nas concentrações de 0,2µM e *Pfu* DNA polimerase (1,25U/50µl), o PCR foi corrido em termociclador nas seguintes condições: 94°C/2min (1 ciclo); 94°C/30s, 55°C/30s para hialuronidase e 60°C/30s para o alérgeno, 72°C/3min (35 ciclos); 72°C/5min (1 ciclo); 4°C/ infinito. Em volume final de reação de 50µl.

As etapas de ligação, transformação, miniprep, seqüenciamento e análise de seqüenciamentos foram realizadas do mesmo modo que descrito anteriormente.

#### 4.16 SUBCLONAGEM

Tomando como base o plasmídeo escolhido para expressão pET-14b foram desenhados iniciadores gene-específicos sense e antisense contendo região

adaptadora com o sítio de restrição para clonagem direcional. Os *primers* foram desenhados seguindo informações contidas em Sambrook e Russel (2001).

Foi escolhido um dos clones sequenciados que continha a codificação de DNA da proteína completa por *Pfu* polimerase, fez-se uma extração plasmidial do mesmo (protocolo já citado). Utilizando esta *miniprep* e os iniciadores desenhados com sítios de restrição, fez-se um *PCR* com uma DNA polimerase de alta fidelidade (com o protocolo semelhante ao descrito anteriormente com a modificação que a temperatura de anelamento foi sempre 60°C).

O produto da extração em gel deste produto de *PCR* bem como o plasmídeo de interesse foi digerido com as enzimas de restrição específicas: Tampão Tango (1x); 5U de NdeI (para hialuronidase) Xho (para o alérgeno) e BamHI (em ambos casos) por 16h a 37°C em banho- maria.

Após a digestão com as enzimas de restrição, para dificultar a recircularização do plasmídeo caso uma das enzimas não tenha sido eficiente, foi feito o tratamento com uma 5'fosfatase (*CIAP*) segundo o protocolo: 10pmol do plasmídeo ou mais, Tampão *CIAP* (1x), 1μL de *CIAP* em um volume de 50μL incubados a 37°C /30min e inativação da enzima a 85°C/15min.

Tanto o inserto quanto o vetor digeridos foram purificados por extração em gel e submetidos à ligação com Tampão ligase (1x) e T4DNA ligase (5U/μl) em bloco de aquecimento a 16°C por 16h. Para avaliação desta reação, um *PCR* desta ligação foi realizado utilizando um *primer* específico e outro universal com concentrações e temperaturas semelhantes ao descrito em 4.12.

O produto da ligação foi transformado em DH5α e a avaliação de que se as colônias transformadas continham o inserto foi realizada por *PCR* de colônia. Clones positivos tiveram seus plasmídeos extraídos e submetidos a seqüenciamento (protocolos anteriormente descritos).

#### 4.17 ANÁLISE DA PROTEÍNA MADURA

A sequência nucleotídica obtida foi traduzida e analisada no programa *ProtParam* (disponível no site: <<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>>) para predição de peso molecular e ponto isoelétrico da proteína.

O alinhamento com sequências proteicas de outras espécies (*GenBank*, acesso no site <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=protein>>) que

apresentaram alta identidade com a espécie de *L. intermedia* foi realizada pelo site *Clustalw* <<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>>.

#### 4.18 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

A preparação plasmidial do clone em fase de leitura (confirmado por seqüenciamento) foi transformada em cepa bacteriana de expressão *E. coli* BL21(DE3)pLysS quimiocompetentes e foram plaqueadas em meio LB-Agar contendo ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL).

Um teste piloto de expressão foi realizado para determinar o tempo ótimo de expressão e a concentração ideal do indutor IPTG. O protocolo foi extraído de Sambrook e Russel (2001) com algumas alterações.

Uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo os antibióticos adequados à 37 °C durante 16h. Esta cultura foi inoculada em diluição 1:100 em 50 mL de meio LB acrescido dos antibióticos e o crescimento monitorado pela determinação da densidade óptica em 550 nm. Quando as culturas atingiram a D.O.(550nm) entre 0,4 e 0,6 foi adicionado o indutor IPTG em diferentes concentrações (0,05mM; 0,1mM; 0,2mM; 0,4mM; e 1,0 mM) e coletadas amostras em diferentes tempos (0h; 0,5h; 1h; 2h; 3h; 4h e 5h) de expressão à 30°C. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel *SDS-PAGE* 12,5% em condições redutoras (5% de β-mercaptoetanol).

As culturas foram centrifugadas (3000xg, 10 minutos) e ressuspendidas em 8 mL de tampão de ligação (fosfato sódico 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM e lisozima 1 mg/mL). A suspensão bacteriana foi congelada a -20 °C por 16h e lisadas por sonicação. O sobrenadante do lisado foi também analisado nas mesmas condições de *SDS-PAGE*.

Outra cepa testada foi a *E. coli* AD494(DE3), a qual foi transformada por eletroporação e plaqueada em meio LB Agar contendo ampicilina (100 µg/mL) e kanamicina (15 µg/mL). O teste piloto de expressão foi realizado em condições semelhantes ao descrito acima: a temperatura utilizada foi a de 30°C e os tempos analisados foram 0h; 0,5h; 1h; 2h; 3h; 4h e 5h; porém a concentração de IPTG de 1,0mM não foi analisada nesta cepa.

Tendo padronizado a quantidade de tempo de expressão e concentração do indutor, foi realizada a variação de temperatura da expressão. Para

BL21(DE3)pLysS foram testadas além de 30°C as temperaturas de 22°C e 16°C e de 22°C para AD494(DE3).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O veneno loxoscélico é capaz de desencadear um quadro cutâneo caracterizado por lesão dermonecrótica com espalhamento gravitacional. Biópsias dos acidentados demonstram um intenso infiltrado inflamatório, cujo mecanismo molecular ainda precisa ser completamente elucidado. O paciente pode desencadear um quadro sistêmico, independentemente do quadro cutâneo, que dentre outras complicações, pode apresentar-se como exantema generalizado (da SILVA *et al.*, 2004; da SILVEIRA *et al.*, 2007; OSPEDAL, 2002; PALUDO *et al.*, 2009; MAKRIS *et al.*, 2009; PIPPIRS *et al.*, 2009).

O estudo isolado das toxinas que compõem o veneno total é um tanto limitado, uma vez que a quantidade de veneno obtido através de coleta por eletroestimulação é de poucos microlitros e geralmente contém cerca de 65µg a 100µg de proteínas totais (FEITOSA *et al.*, 1998; SAMS *et al.*, 2001). Para a purificação das toxinas diretamente do veneno seriam necessários miligramas de veneno total para que fossem obtidos poucos microgramas da toxina de interesse. Tratando-se da fração acima de 40 kDa e mais especificamente de hialuronidases, onde sabe-se que suas quantidades são diminutas, isto é ainda mais agravante (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007; NAGARAJU; DEVARAJA; KEMPARAJU, 2007).

### 5.1 5'-RACE DO ALÉRGENO de *L. intermedia*

Visto o obstáculo da quantidade de veneno no estudo do loxoscelismo, da Silveira (2006) e colaboradores construíram uma biblioteca de cDNA da glândula produtora do veneno de *L. intermedia*, onde dentre outras toxinas obtiveram uma parte da sequência de um alérgeno desta espécie. Esta sequência tinha o tamanho de 567 nucleotídeos e apresentava alta identidade com alérgenos de aranha (*Lycosa singoriensis*), crustáceo (*Caligus rogercresseyi*), ácaro (*Argas monolakensis*), inseto (*Solenopsis richteri*) e escorpião (*Tityus serrulatus*).

A partir desta sequência foram desenhados dois oligonucleotídeos reversos gene-específicos: *Allergen 5'RACE R1*: 5'- CAA CTG GAA TGT CTG GCC ATT ATC CTT G – 3' e *Allergen 5' RACE R2* 5'- GCT TGA CAG CTG CTG ACC AGT TTG – 3'. Apesar de possuírem a temperatura de fusão (*T<sub>m</sub>*) um pouco elevada, 66.8 °C e 67.3°C respectivamente, visto que Sambrook e Russel (2001) sugerem que as

temperaturas de anelamento situem-se entre 50 - 58 °C para o 5'RACE e sejam 5 °C menores que as *Tms* calculadas; os parâmetros de % de CG, formação de “grampo” e dímeros estavam adequados.

Tendo sido sintetizados os *primers*, para a obtenção do cDNA específico correspondente à porção 5' do alérgeno foi necessária a extração do RNA total de 100 glândulas produtoras de veneno de *L. intermedia*.

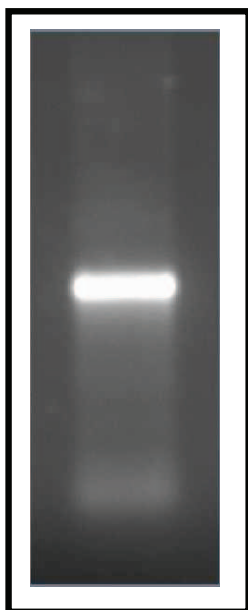


FIGURA 7 - RNA TOTAL DAS GLÂNDULAS PRODUTORAS DE VENENO DE *L. intermedia*. RNA total extraído de 100 glândulas produtoras de veneno de *L. intermedia*. Perfil obtido em eletroforese de agarose 1%

De todo RNA produzido por uma célula, a porcentagem de 80-85% corresponde ao RNA ribossômico e uma pequena porcentagem (1-5%) ao RNA mensageiro (ALBERTS *et al.*, 2004). No perfil da eletroforese do RNA total (FIGURA 7) existe uma banda de grande intensidade que corresponde ao RNA ribossômico. Bandas de pouca intensidade de tamanhos variados, visualizadas quase que como um borrão, correspondem aos RNAs mensageiros. No perfil de RNA total eucariótico, geralmente espera-se de 2-3 bandas bem definidas, duas das quais de maior intensidade correspondentes aos RNAs ribossômicos de 18s e 28s (PROMEGA *RNA Analysis Notebook*). No entanto este é o perfil sempre observado de RNA total íntegro da glândula produtora de veneno de *L. intermedia*.

O RNA total foi dosado e sua relação à concentração protéica foi  $\geq 1.8$ , considerada ideal segundo Sambrook e Russel (2001). Estes mesmos autores sugerem para uma reação de transcrição reversa o uso de 10pg a 1 µg de RNA total. Para as reações de transcrição reversa do alérgeno foram sempre utilizados 1 µg de RNA total conforme já padronizado no laboratório em outros trabalhos.

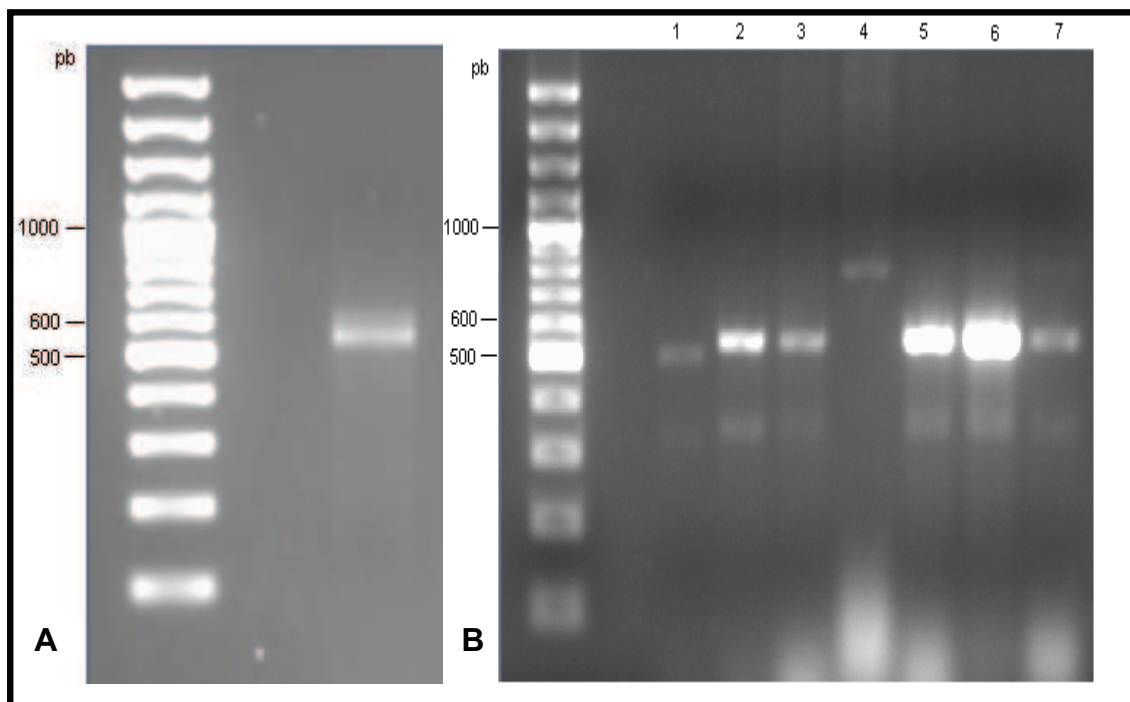


FIGURA 8 – 5'-RACE DO ALÉRGENO DE *L. intermedia*. (A) Eletroforese em agarose 2% demonstra que o produto de reação do 5'RACE tem o tamanho entre 500 e 600pb. (B) PCR de colônia da construção pGEM-T+5'RACE em DH5 $\alpha$  eletrocompetentes. A figura demonstra 7 das 25 colônias testadas. Clones considerados positivos possuem amplificação na altura entre 500 e 600pb. 3 destes clones foram submetidos à sequenciamento.

Em eletroforese de agarose pode-se observar que o produto final da reação de 5'RACE para o alérgeno de *L. intermedia* teve o tamanho de aproximadamente 550pb (FIGURA 8). Como o tamanho dos alérgenos de veneno de espécies de vespas, abelhas e formigas, consideradas espécies “próximas” à aranha, variam de 10-50KDa (BILÓ *et al.*, 2005), não se tinha idéia do tamanho exato da banda. Sendo assim, prosseguiu-se com o trabalho e esta banda foi extraída com auxílio de kit apropriado e ligada em vetor de clonagem pGEM-T. A construção foi transformada em *E. coli* DH5- $\alpha$  eletrocompetentes e para a triagem foi utilizado o sistema de  $\alpha$ -complementação, no qual colônias incolores provavelmente contém inserto e colônias azuis não. Três clones considerados positivos no PCR de colônia foram seqüenciados.

O resultado foi favorável, pois as seqüências nucleotídicas sense e antisense dos clones escolhidos apresentaram entre si no mínimo 98% de identidade, além de apresentarem alta similaridade pelo *BLASTx* com as espécies de escorpião (*Tityus serrulatus*), aranha (*Lycosa singoriensis*), crustáceo (*Caligus rogercresseyi*) e insetos (*Rhynchium brunneum* e *Pachycondyla chinensis*). A sequência consenso destes



sequenciamentos foi tomada como base para o desenho dos *primers* para a clonagem do alérgeno completo.

Como resultado do desenho, temos os oligonucleotídeos: *Forward Venom Allergen* 5'- CTA CTC TGG AAA GAC TTG GAA C – 3' com  $T_m$  de 59.7°C e *Reverse Venom Allergen* 5'- GAA ACT TAC GGC AAC CTT CAT AGC – 3' com  $T_m$  de 63.4°C.

## 5.2 CLONAGEM DA SEQUÊNCIA COMPLETA DO ALÉRGENO

As sequências e estruturas de alérgenos de venenos têm sido determinadas nos recentes anos (ARLIAN, 2002; BILÓ *et al.*, 2005; PEIREN *et al.*, 2006). Com o intuito de conseguir a clonagem da sequência completa desta toxina e um sequenciamento mais fidedigno foram utilizados para reação de RT-PCR: oligo(dT)<sub>17</sub>, *Forward* e *Reverse Venom Allergen* e Pfu DNA polimerase.

Como resultado obteve-se em eletroforese de agarose 1,5% uma banda específica na altura entre 1200 e 1500pb (FIGURA 9A). Visto a sobreposição da sequência da biblioteca de cDNA com a obtida pelo 5'RACE apresentar este tamanho, o resultado foi considerado positivo e satisfatório para o prosseguimento do trabalho.

Após ligação deste produto de PCR em pGEM-T, da mesma forma que a clonagem anterior, a construção foi transformada em cepas DH5- $\alpha$  eletrocompetentes e triadas pelo auxílio da coloração das colônias (transparentes ou azuis). 50 colônias foram testadas, sendo 16 positivas (FIGURA 9B). Destas, três foram escolhidas para reação de sequenciamento.

Os sequenciadores automáticos utilizados apresentam a resolução entre nucleotídeos confiavelmente de 400-900pb (<[http://www.artisan-scientific.com/info/Megabace\\_Specs.pdf](http://www.artisan-scientific.com/info/Megabace_Specs.pdf)>). Em nossas reações frequentemente a

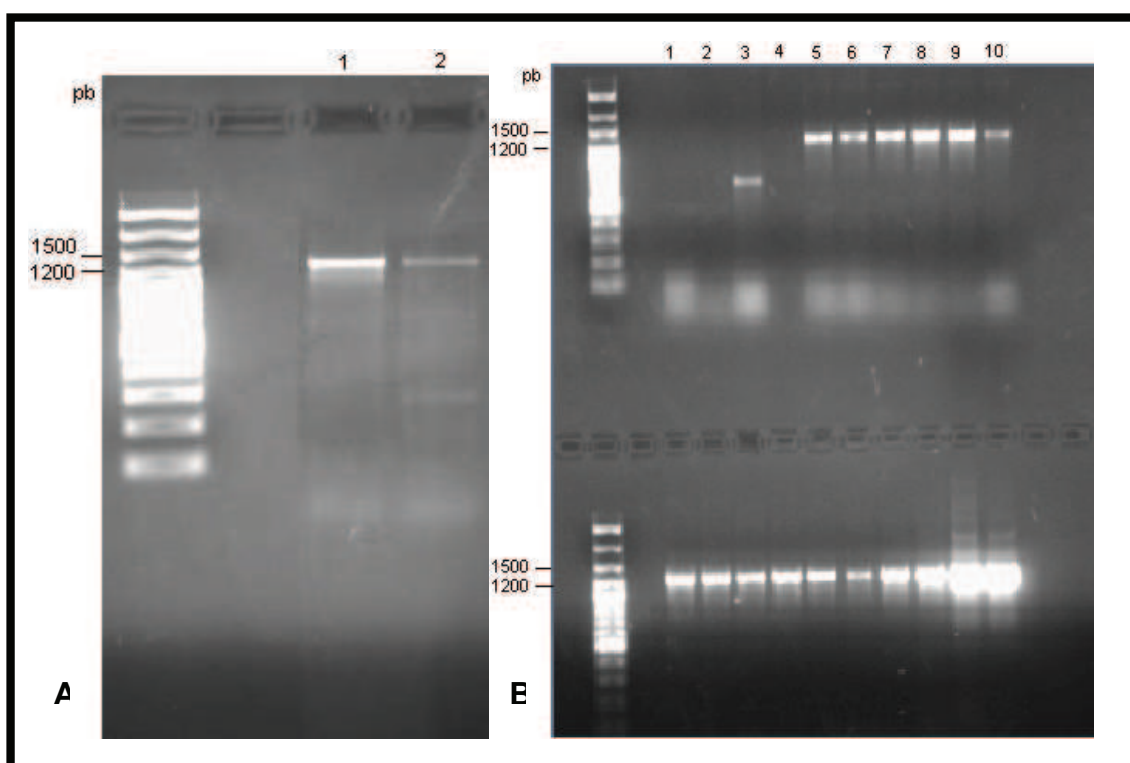


FIGURA 9 - CLONAGEM DA PROTEÍNA COMPLETA. (A) Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto de RT-PCR para proteína completa. A altura do produto encontra-se entre 1200 e 1500 pb. (B) PCR de colônia da transformação da construção alérgeno+pGEM-T em DH5- $\alpha$  eletrocompetente. Em clones positivos encontra-se bandas entre 1200 e 1500pb.

resolução apresentava-se de 400-600pb. Como era ideal uma sobreposição considerável entre a sequência sense e antisense da toxina e por esta apresentar um tamanho entre 1200-1500pb foram necessárias várias reações para obtenção de sequenciamentos de ótima qualidade. O resultado é demonstrado a seguir na FIGURA 10.

A análise da sequência completa do alérgeno de *L. intermedia* demonstra que seu tamanho é de 415 aminoácidos e que esta proteína possui peptídeo sinal de endereçamento para o retículo endoplasmático, típico de proteínas secretadas (GIBBIS; ROELANTS; O'BRYAN, 2008). Segundo o programa *Protparam* seu ponto isoelétrico é de 8.4 e seu peso molecular é de aproximadamente 46,2kDa.

O alérgeno, segundo o banco de dados *Pfam* é classificado dentro de uma família denominada CAP: proteínas ricas em cisteína. Na FIGURA 10, as cisteínas encontram-se destacadas em vermelho e a porcentagem deste aminoácido, segundo *Protparam*, é de 4.6%. Outro destaque é dado para os possíveis sítios de N-glicosilação colocados na figura dentro de retângulos.

A família CAP é uma grande família de proteínas secretórias ricas em cisteína que são encontradas amplamente em grande número de organismos, incluindo procariotos e invertebrados. Membros desta família são frequentemente secretados e possuem ação parácrina ou endócrina. A estrutura conservada dentro das superfamílias resulta fundamentalmente em funções similares, no entanto regiões fora do core de conservação alteram a especificidade e suas funções biológicas. Em mamíferos entre nove superfamílias estão inclusos inibidores de peptidases e proteínas semelhantes à receptor de manose (MILNE *et al.*, 2003).

Na FIGURA 11 está representado o alinhamento da sequência aminoacídica do alérgeno de *L. intermedia* com alérgenos de outras espécies. Pode-se verificar que esta proteína do veneno de aranha marrom possui alta similaridade com espécies de outros artópodes como parasita (*Ixodes scapularis*), aranha (*Lycosa*

*singoriensis*), crustáceo (*Caligus rogercresseyi*) e insetos (*Pediculus humanus corporis*, *Solenopsis richteri*, *Nasonia vitripennis*, *Rhynchium brunneum*, *Pachycondyla chinensis* e *Microctonus hyperodae*).

De acordo com a TABELA 5 pode-se notar que o alérgeno de *L.intermedia* possui maior identidade aminoacídica (positividade) com espécies de formiga (*Pachycondyla chinensis* e *Solenopsis richteri*) e piolho (*Pediculus humanus corporis*).



<u>L.intermedia</u>	1	---MSAMYQILLFVALLQLLCQWSASES---CPSTLYRYS-----QKH
I_scapularis	1	-----MTPMLLWTIVATVAWQFPSPARSONCSHHLAYH-----ENH
Solenopsis	1	-----TNYCNLQSCRFNN-----AIH
P_chinensis]	1	-----TEGG-----AVH
R_brunneum	1	-----MTKIDLLARVFVIATIIALATAVDYKCLKCPK-----TKH
M_hyperodae	1	-----MEQIKYLLICIFSSAASSSLOQAYENCADWANPGQ-----SQKH
Caligus	1	MTTRILPLLLIFFVILERSSVISKDLESIMDAVNVISGPNIVPKHIKQGCDCYCSLSSRN
P_humanus_corporis	1	--MRPLNFSIIVCGVIL-----MMCLTMGCAKLSH-----YCSLCENH
Nasonia_vitripennis]	1	-----MTAGRVAKLLIAG-----FLLIG
L_singoriensis	1	----MSAPVGPISLILALCALCVLNAVRSAYCPCDPYRYS-----DQH
<u>L.intermedia</u>	39	TYCLSPNPSCQILARGVS-----SQSIEILRVHNEYRSRIATG---KESTGQLHSASN
I_scapularis	38	TLCKS-EAGCKLQVTGTE-----ENMKQELILKLNHNYRNLIASG---NEAN--MPEASN
Solenopsis	17	TMCCY-TSPTPGPMCLAYSNVGFTIAEKDAIYNKHNEIRCRVASGHEMFGINGEOPPAVK
P_chinensis]	8	TMCCY-TSPQPSNCGTYNSNAHITAAADKETILKVHNEIRCKVKAGCETFRNGEQPPASN
R_brunneum	37	TMCIYGTNSHPSPNCGVVKSGSGETDQKKEILKEHNDYSHKVASGEEKRGVNGSQPPASN
M_hyperodae	41	TMCIYPTTALGN-KCNEGRIIQTEADKQVILCLHNEIRAKVASGEGESQGSNGEQP-AGK
Caligus	61	TYCRYGQSETVS-CVGVISAGLESEAVKCEILNVHNEIRPKVANG---ETGRLPGTASN
P_humanus_corporis	36	TMCCY-HGPGPN-CERIGGYGVT-HSEKQILDLHNMYRKIVANGNEKSGGSGSQPPAAD
Nasonia_vitripennis]	20	SGVRTADAKKGCARYEIVIESGELPCEIKCEIVEVHNRYRCKVARG---LVKGQPPASN
L_singoriensis	41	SYCVGVCCSCAKYRRGVS-----FWLKEELVRLHNLRSKVAGG--KSHSVDHLPRAIN
<u>L.intermedia</u>	90	MLQEWDDDELAPVACAHASOCQEFHDCNECRQVKNFP-VGONLYQSWSTSSGTPQP-N-W
I_scapularis	86	MLEMEWDDDELAPVACAHASOCQEFHDCPPCREMEKFSVGVONILCDRTTRD-NPQP-D-W
Solenopsis	76	MFNLTWDELATIAQRWANOCQFEHDA--CRNVERFA-VGONIAMSSSGKNKST----L
P_chinensis]	67	MFNLTWDELATIAQRWANOCQKIGHDG--CRNVERYQ-VGONIAMSGSTAKGPCN----M
R_brunneum	97	MEFMTWDELAFVACIWANOCINHDK--CRSVSRFS-VGONLASKSTTENDFPF----V
M_hyperodae	99	TGPIRWDELAEIAQRWVNOCFEHDK--CRNTKANS-VGONIYMMGSSEKSENTH-DIL
Caligus	116	MRKLVWDELAREACIWNOCRTHEDE--PNTCKHKE-VGONIAWHSAGETEDPD----E
P_humanus_corporis	93	MMKLCWDDDELAEVAQRWALQCRLEHDT--CRADPRK-VGONIYWKWKY-PTHNVN---W
Nasonia_vitripennis]	75	MREMYWDELAKACIWANHCQFEHNLGHERFVARFD-VGONLGLSPSICERRDNEMRAFE
L_singoriensis	93	MLEMWWDELAEVAQRWSDKCRKSDCEICRFVGRFG-VGQILFEFDDGKMDGKDME----
<u>L.intermedia</u>	147	SAAVKIWYDEVSNFOAHLISS--DF-GKARGVVGHTQVIWAESWKVGCYSAKYD-NGQT
I_scapularis	143	ESCIRRWYDEVTLFEN---SARSF-PQFDVVTGHTQVWVATTWKIGCGMARNPS-KDHF
Solenopsis	129	SDMILLWYNEVKIFDNRMISSPSDGNILMHVGHYTOVWVATTKIGCGRMFT----ED
P_chinensis]	120	NNLVQMWINEVNALNAATVSSMPSDGNFMKIGHYTOVWVGFTTKVGCGLTICHL----DG
R_brunneum	150	VELTQIWENEVSTFDKNNISLPSAG--ISPTGHYTOVWVAKSNKLGCGSIKHF----KD
M_hyperodae	155	TASVNSWYSEVKIFDNRSVRE----KEEFTTGHYSQVWVGDTTHVGCGLVGYH----DS
Caligus	170	KTATIERWYDEINLAR-GSVLSY---FNSPTGHFTQLIWADTTELIGCGFVANTGRKRKG
P_humanus_corporis	146	TEATIASWYDEVSLFNPNEVRSR---EDSPTGHYSQVWVHDTHEVGCGLVGYH----RRD
Nasonia_vitripennis]	134	SKHIKTWIDENECPKFAPISSAGG-----TGHYTOVIWADTTHVGCGLVGYH----EG
L_singoriensis	148	-NEFFSRMALQSPRKEQVARITAG-----TNPKTAQILWATTWRIIGCGFLTGN--YPGN
<u>L.intermedia</u>	205	FQ---LYTCNYGPAGNMVYKGEIYKCGQACSPCKNTCCGSSCGQS---PSYNGLCQVEKK
I_scapularis	198	FVYDLIYTCIYGPAGNEIGGDYELGEACSCQCEGTCCGSSCDEGGIESRFKSLCKPTTF
Solenopsis	185	NWNKHYYVCNYGPAGNVLGACIYEIK-----
P_chinensis]	176	KFYKCYLVCNYGPAGNMEGAPFYQ-----
R_brunneum	204	GWNKHFTVCNYGPEGNLYGQSYEV-----
M_hyperodae	207	GFYTTVACNYSAGNLIIGCTVYPTL-----
Caligus	225	DAIQRIYVCNYGPEGNSVSSPYKCGYQCSECHLGFGACDDSLCGPGPGGVAPTTPSPV
P_humanus_corporis	194	YGLNRLYVCNYGPEGNWINEFVYTVGEFCSKCPQGC-SCDEYLOG-----
Nasonia_vitripennis]	183	ATMSQFYVCNYGPAGNMIMKQFYDVGKQK-----CGNELVKSRTYLGLCAMREPPSF
L_singoriensis	200	GRRYTQIVCNYGPEGNEEGEIVYKAGSVCS--CPANTCCGDACKHNKLKANYHGLCKVIDE
<u>L.intermedia</u>	259	QRPIYPPKPGNYIYYCNFEPGTN--CHISTPAG-TKKWEISHTLSDSYIGVVLEGGESAM
I_scapularis	258	DGPSTAVSKNGLIWACLFNNETQ--ESKITDDPPQAFKHRTLFSGGFLETVVEGGQRAE
Solenopsis		-----
P_chinensis]		-----
R_brunneum		-----
M_hyperodae		-----



Caligus	285	PDPYEQEPYKDPFYIPEQPTYPA--PQPSPPQSNYPYNPNYPYSQPQQPYQPPSYNNNP
P humanus corporis	238	-----KFL-----
Nasonia vitripennis]	235	QCSSKGKSARRLLSGRKKKSHAS--KKCKGSECFARRAMSTFETVEVNDTDSNLKKVYNL
L_singoriensis	260	NLPPEGNVPHKKTGNEVFYCGFNDESDCRHTVEGVDRWIRNVTTGGTWLNTYLGNYGHTV
<b>L.intermedia</b>	316	FNITKTFK-ALPSQCFSISFRKGPVAGQQSNNAAKEHFYLIDMS-YPMDVPLSMDSAQF
I_scapularis	316	VTFSRLIKGGTTPFCMTIEYSKGPNMAGERSNSTLRLLLTSPALPLFQVDAEMGRGVSGQ
Solenopsis		-----
P chinensis]		-----
R brunneum		-----
M hyperodae		-----
Caligus	343	YGYNPNPYGYGGYNSGGYNNGGYGNPGYGNYGNGYGTTRFCNLLNI-----
P humanus corporis		-----
Nasonia vitripennis]	293	ITINVFH-----
L_singoriensis	320	IEVRSAHHLQVRQAMPGHQDPQWTHGGRTTSLVPAVRGFGGGRQILNLTHLPPCRR----
<b>L.intermedia</b>	374	MSFGMTLNYNMAMKVAVSFTVPRGAPAYLELKDIFVKSGSC--
I_scapularis	376	QTYGFSMDISLPVQIGFSFVSPENSTAQYFSIYKVVNTHGACQY
Solenopsis		-----
P chinensis]		-----
R brunneum		-----
M hyperodae		-----
Caligus		-----
P humanus corporis		-----
Nasonia vitripennis]		-----
L_singoriensis		-----

FIGURA 11 – SIMILARIDADE DO ALÉRGENO DE *L. intermedia* COM ALÉRGENOS DE OUTROS ARTRÓPODES. O alinhamento foi obtido através do site <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> e o sombreamento através da ferramenta [http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html), na qual, a positividade cresce do branco para o preto. Em preto os aminoácidos conservados e em cinza substituições conservativas. As seqüências comparadas foram: EEC14483.1, ABX75373.1, ACO10214.1, EEB16252.1, P35779.2, XP\_001605605.1, ACC93935.1, ACA96507.1 e ABY19390.1

TABELA 5 – IDENTIDADE AMINOACÍDICA ENTRE ALÉRGENO DE *L. intermedia* E ALÉRGENOS DE DIFERENTES ESPÉCIES

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
(1) <i>L_intermedia</i>		33	29	22	35	36	26	33	37	31
(2) <i>I_scapularis</i>			21	19	32	33	24	32	30	26
(3) <i>L_singoriensis</i>				15	26	28	27	25	26	21
(4) <i>C_rogercresseyi</i>					37	32	26	29	33	28
(5) <i>P_humanus</i>						36	27	37	39	35
(6) <i>Solenopsis</i>							33	48	54	42
(7) <i>N_vitripennis</i>								32	31	22
(8) <i>R_brunneum</i>									46	33
(9) <i>P_chinensis</i>										43
(10) <i>M_hyperodae</i>										

NOTA: Os números de 1-10 na primeira linha da tabela correspondem às espécies indicadas na primeira coluna. Os números que não estão em negrito dizem respeito ao Score de positividade obtido pelo alinhamento em < <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>>

### 5.3 SUBCLONAGEM DO ALÉRGENO DE *L. intermedia*

Durante os últimos dois anos têm crescido o número de estudos de expressão e resolução de estruturas tridimensionais de alérgenos de veneno e estes estudos têm nos ajudados a entender mecanismos moleculares de reações de hipersensibilidade, bem como, família de proteínas relacionadas entre espécies (ARLIAN, 2002; HOFFMAN, 2008).

Para obter a expressão do alérgeno de *L. intermedia* foi escolhido inicialmente o sistema mais simples de expressão, o bacteriano, pois é um sistema relativamente simples de se trabalhar quando comparado a sistemas eucarióticos (SOLDATOVA *et al.*, 1998; TEO *et al.*, 2006). Visto o alérgeno apresentar prováveis sítios de N-glicosilação e ser sabido que estes carboidratos possivelmente ajudem no dobramento protéico, ou possam ser epítomos de reconhecimento de IgE, tinha-se consciência que a escolha do sistema procariótico poderia comprometer a solubilidade e atividade biológica desta proteína.

Em contrapartida, alérgenos de outras espécies expressos em sistema procariótico apresentaram ligação à IgEs de soro de pacientes (SOLDATOVA *et al.*, 1998; VARASTEY *et al.*, 2009; BORGES *et al.*, 2009). Corroborando com estes dados, outras toxinas do veneno de *L. intermedia* foram expressas em plasmídeo pET-14b (da SILVEIRA *et al.*, 2006, 2007; APPEL *et al.*, 2007; ) e foram enzimaticamente ativas. Este sistema plasmidial fusiona uma cauda de 6 histidinas (His6x) à proteína recombinante de interesse o que permite a purificação desta em uma única etapa cromatográfica geralmente. Sendo assim, pET-14b foi o plasmídeo de escolha para a expressão.

Dentre o sítio de clonagem múltiplo existente no pET-14b foram escolhidas as enzimas XhoI e BamHI, pois desta forma se preservaria regiões importantes tais como a sequência de ligação ao ribossomo (rbs). Outros motivos da escolha destas enzimas foram por estas não possuírem sítios de reconhecimento muito longos, uma boa atividade relativamente (<<http://home.medewerker.uva.nl/d.rijnsburger/bestanden/poster2006.pdf>>) e a sequência do cDNA da toxina não ser reconhecida por estas enzimas. Sendo assim foram desenhados um par de iniciadores (FIGURA 10) para a subclonagem do alérgeno em vetor de expressão. São eles *Sense Allergen* madura 5'- CCC TCG AGC GCG AAT CTT GTC CGT CAC- 3' e *Antisense allergen* madura 5'- GCG GAT

CCG CTA ACA GCT TCC GGA TTT TAC- 3', onde os nucleotídeos sublinhados representam o sítio de clivagem das enzimas Xho e BamHI e, as *Tms* calculadas são 72.1°C e 70.7°C respectivamente. Como o sistema escolhido é procariótico, o qual não possui retículo endoplasmático, os *primers* foram desenhados a partir do primeiro aminoácido da proteína madura até o código de terminação.

Apesar do PCR, usando como molde o produto da ligação, ter a banda na altura adequada (FIGURA 12); o que demonstra que a ligação ocorreu entre alguns vetores e insertos, a ligação não foi tão eficiente a ponto de transformar cepas de *E. coli* DH5α competentes. Foram tentados diversos protocolos, porém nenhum com resultado positivo (dados não mostrados).

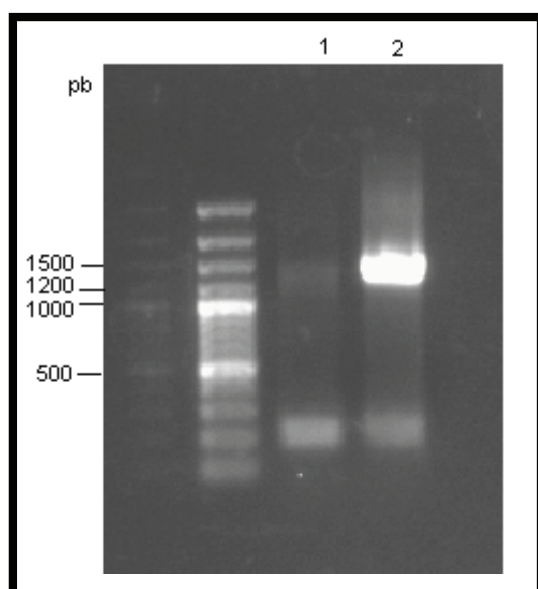


FIGURA 12: PCR DA LIGAÇÃO. PCR da reação de ligação com *primers* universais do vetor. Em 1 e 2 são ligações realizadas com dois diferentes tampões. É possível observar uma banda de intensidade fraca na altura entre 1200 e 1500pb em 1 e, em 2, uma banda de intensidade mais forte na mesma região.

Foram desenhados um novo par de *primers* com alguns nucleotídeos a mais na porção 5' para tentar melhorar a eficiência de clivagem e assim conseguir uma ligação mais eficiente, além da utilização de uma 5'fosfatase (*CIAP*) que ajuda a evitar a recircularização do plasmídeo. Porém, até o momento não houve resultado positivo.

Desenhando oligonucleotídeos para a clonagem do cDNA completo, incluso peptídeo sinal, para o mesmo vetor de expressão e sob as mesmas condições de reações, obteve-se resultado positivo. Os *primers* citados são *Sense allergen1*: 5'-CGC TCG AGG GCA TGG AGG AAA ATG TCT G-3' e *Antisense Allergen 1* 5'-GCG GAT CCG CTA ACA GCT TCC GGA TTT TAC- 3' com *Tm* de 70.9°C e 70.7°C respectivamente.



Em três dos clones considerados positivos (FIGURA 13) foi realizado uma mini preparação plasmidial e estas foram submetidas ao sequenciamento automático. A análise dos sequenciamentos revelou que não havia ocorrido nenhuma alteração de base durante os ciclos de PCR e que o cDNA estava em correta fase de leitura.

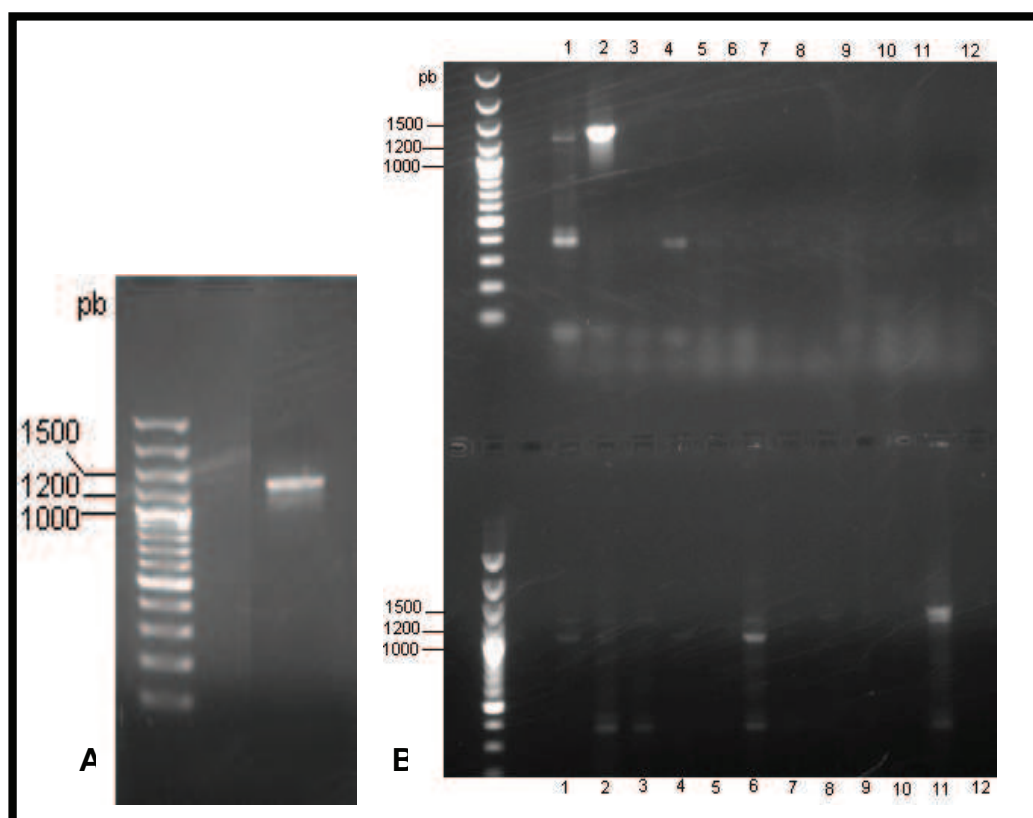


FIGURA 13 – SUBCLONAGEM DO ALÉRGENO DE *L. intermedia* EM pET-14b. (A) PCR com os oligonucleotídeos gene-específicos com região adaptadora correspondente aos sítios de restrição de XhoI e BamHI. (B) PCR de colônia representativo dos 120 clones testados onde os considerados positivos exibem banda entre 1200-1500pb, algumas com intensidade forte (*lane 2*) e outras com intensidade fraca (*lanes 1 e 1, 2, 3, 6 inferior*).

#### 5.4 3´RACE DE HIALURONIDASE DE *L. intermedia*

Hialuronidasas, enzimas responsáveis pela degradação de glicosaminoglicanos, principalmente ácido hialurônico, foram descritas em venenos de diferentes espécies de serpentes, aranhas, escorpiões, vespas, abelhas e lagartos (LU *et al.*, 1995; KREIL, 1995; STERN, 2004; KOLARICH *et al.*, 2005; KEMPARAJU; GIRISH, 2006). É sugerido que tais enzimas atuem como fatores que aumentam a difusão das demais toxinas no organismo da vítima e estejam

associadas com espalhamento gravitacional das lesões de pele. Além de ser identificada como um componente alergênico majoritário em venenos de escorpiões e insetos (YOUNG; PINCUS, 2001; VEIGA *et al.*, 2001a, da SILVA *et al.*, 2004; BARBARO *et al.*, 2005; da SILVEIRA, *et al.*, 2007a).

Em estudo com o veneno de *L. intermedia* da Silveira (2007) e colaboradores descobriram que a hialuronidase deste veneno é uma endo- $\beta$ -N-acetil-D-hexosaminidase e que sua atividade lítica encontra-se na região de 41 e 43KDa. Com o intuito de descobrir a sequência do cDNA que codifica esta enzima foram analisadas sequências nucleotídicas parciais (EST) de hialuronidases de artrópodes constantes na literatura.

O resultado da análise das sequências foram dois iniciadores sense: *Hyal 3' RACE 2* 5'-CCG CAT TGG TTT TAG CCG CAT TC-3' e *Hyal 3' RACE 1* 5'-CGA ATC AAT CAA CGG TGG CAT CCC TC-3'; apresentando temperaturas de fusão de 66.3°C e 68.3°C respectivamente. Como em todos os oligonucleotídeos desenhados neste trabalho parâmetros como porcentagem de CG, temperatura de formação de dímeros e "grampos" foram considerados antes da escolha para a síntese.

Utilizando o RNA total extraído de 100 glândulas de aranhas *L. intermedia* (FIGURA 7) e oligo(dT)<sub>17</sub>*adaptor* como iniciador foi realizada uma reação de transcrição reversa para a captura dos cDNAs correspondentes aos RNAs mensageiros. Mas de forma diferente das reações de transcrição reversa padronizadas até então, a quantidade de RNA total para uma reação positiva foi de 2  $\mu$ g de RNA total.

Reações de PCR foram realizadas utilizando estes cDNAs como moldes e cada um dos *primers* gene-específicos desenhados como sense em duas reações separadas. Com a eletroforese em gel de agarose 1,5% dessas reações foi possível obter o perfil apresentado na FIGURA 14.

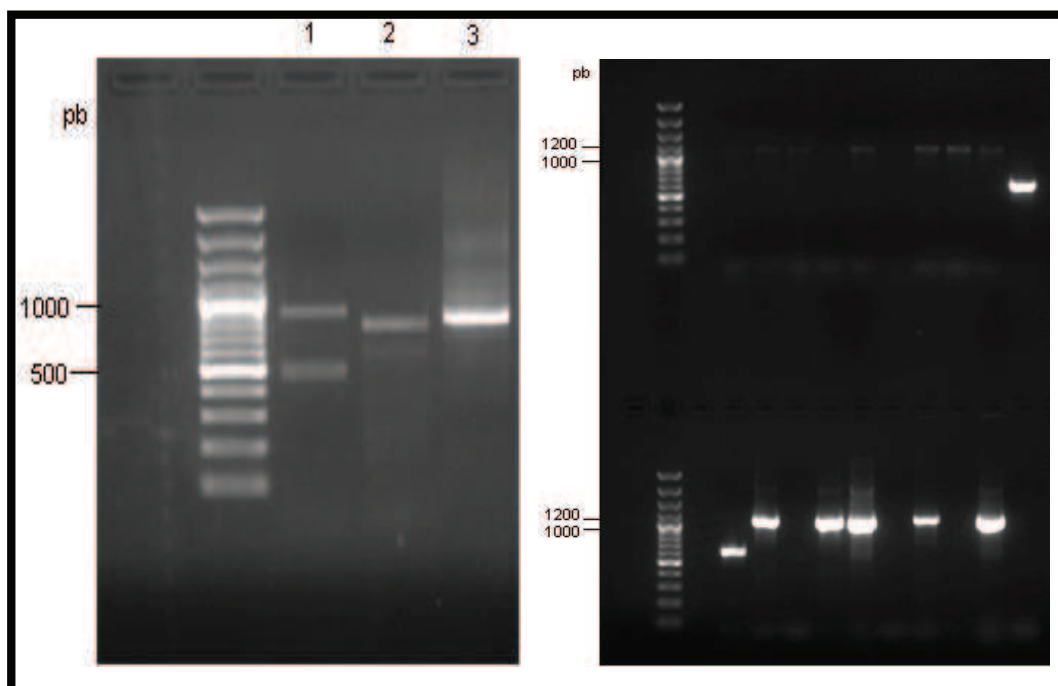


FIGURA 14 - ELETROFORESE DO PRODUTO DE RT-PCR (3'RACE) DE HIALURONIDASE DE *L.intermedia*. (A) Produto de aproximadamente 1000pb foi visualizado para a reação com *Hyal 3' RACE 1* e *Hyal 3' RACE 2* em eletroforese de agarose 1,5%. Em 3 temos um controle da reação utilizando oligonucleotídeos de recombinante de fosfolipase da espécie em estudo. (B) PCR de colônia. Clones considerados positivos apresentaram bandas em aproximadamente 1200pb e alguns deles foram submetidos a sequenciamento automático.

Os produtos do RT-PCR apresentaram bandas em aproximadamente 1000pb tanto para reação com *Hyal 3' RACE 1* (FIGURA 14 *lane 1*) quanto para reação com *Hyal 3' RACE 2* (FIGURA 14 *lane 2*). As bandas com intensidade mais forte em aproximadamente 1000pb foram consideradas as específicas porque se sabia a região de desenho dos *primers* na sequência de hialuronidases de outras espécies e o tamanho destas enzimas em *L. intermedia* (da SILVEIRA *et al.*, 2006; FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008). A diferença de pares de bases entre um *primer* e o outro também estava dentro do previsto.

Sendo assim as bandas foram extraídas do gel e ligadas em plasmídeo de clonagem pGEM-T. A construção resultante foi transformada em DH5- $\alpha$  eletrocompetente e recuperadas em LB/X-Gal/IPTG para triagem. O PCR de colônia nos indicou a presença do inserto em vários clones dos 35 escolhidos (FIGURA 14B). Três destes foram submetidos a sequenciamento com iniciadores universais.

A análise dos eletroferogramas indicou que os *primers* realmente haviam sido específicos e que a sequência de *L. intermedia* apresentava identidade com as hialuronidases de *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Apis melífera*, *A. cerana cerana*

e *Bos taurus*, segundo alinhamento no *BLASTx*.

Tendo agora uma parte da sequência da hialuronidase de *L. intermedia* foram desenhados dois iniciadores reversos para buscar a porção 5' da sequência. Foram eles: *Hya 5' RACE 1* 5'- CTC CAT GCT TCC CAG TCG ATG ATG C -3', o qual apresentou *T<sub>m</sub>* de 68.0°C e *Hya 5' RACE 2* 5'- GTT GCA GGG TAG ACA ACA TCC ACG- 3' de *T<sub>m</sub>* igual à 66.5°C.

Foi necessária a extração de novas glândulas de aranhas, da mesma forma o RNA total foi dosado e sua relação à proteínas foi  $\geq 1.8$ . O perfil da nova extração foi semelhante ao representado na FIGURA 7.

Para reação de 5'RACE foram utilizados os *primers* desenhados e o oligo(dT)*adaptor* como sense. Após eletroforese de agarose, pode-se constatar que a reação embora apresente um borrão de bandas inespecíficas, teve uma banda majoritária em aproximadamente 500pb (FIGURA 15A). Com o tamanho da sequência obtida anteriormente e sabendo que as hialuronidases de *L. intermedia* têm o tamanho de 41-43KDa, esperava-se realmente um fragmento nesta altura. Este produto de PCR foi como anteriormente citado ligado em pGEM-T e transformado em *E. coli* DH5 $\alpha$ . Três mini-preparações de plasmídeo de três diferentes clones positivos no *PCR* de colônia (FIGURA 15B) foram submetidos à sequenciamento.

Após análise dos eletroferogramas, as seqüências sense e antisense dos clones escolhidos apresentaram entre si no mínimo 99% de identidade, além de apresentaram alta identidade no *BLASTx* com as espécies de escorpião (*Mesobuthus martensii*), serpentes (*Echis ocellatus*), insetos (*Apis cerana cerana*, *Lutzomyia longipalpis*) e mamífero (*Mus musculus*). Sobrepondo a sequência já conhecida com a conseguida nesta última análise obtivemos a sobreposição de pelo menos 150pb entre elas (dados não mostrados). Assim, obtivemos uma sequência prévia da hialuronidase.

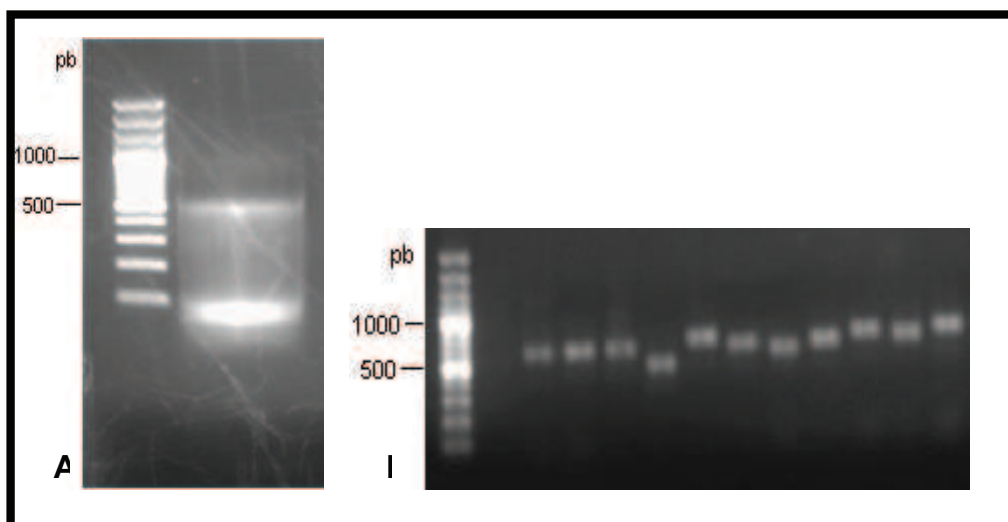


FIGURA 15 - 5'RACE DA HIALURONIDASE DE *L. intermedia*. (A) Eletroforese em agarose 2% demonstra que o produto de reação do 5'RACE tem o tamanho aproximado de 500pb. (B) PCR de colônia da construção pGEM-T+5'RACE em DH5 $\alpha$  eletrocompetentes. A figura demonstra algumas das colônias testadas. Clones considerados positivos possuem amplificação próxima à altura de 500pb. 3 destes clones foram submetidos a sequenciamento.

## 5.5 CLONAGEM DA SEQUÊNCIA COMPLETA DO cDNA DA HIALURONIDASE

Embora os primeiros relatos de hialuronidase tenham sido realizados no final da década de 1920. Poucas destas enzimas de origem de veneno foram clonadas e caracterizadas até os dias de hoje (DURAN-REYNALS, 1928; NAGARAJU; DEVARAJA; KEMPARAJU, 2007)

Com o objetivo de conseguir clonar o cDNA desta toxina e obter uma sequência confiável da mesma, iniciadores específicos para as extremidades 5' e 3' foram desenhados tomando como base a pré-sequência obtida pelas reações de RT-PCRs anteriores. Como resultado, com  $T_m$  de 61.6°C: *Forward Hyaluronidase* 5'- GTA TGT AGA TCG GCG TTC AGG – 3' e com  $T_m$  de 63.6°C, *Reverse Hyaluronidase* 5'- CTG CTC ACA GTA TCG TCC TTC G – 3'.

Da mesma forma que para o alérgeno, foi utilizado um iniciador genérico para selecionar todos os RNAs mensageiros. Com a reação de PCR foi amplificado o cDNA de interesse utilizando os *primers* gene-específicos. O produto desta reação de PCR foi resolvido em eletroforese de agarose 1,5%, sendo visualizado banda de alta intensidade específica na altura entre 1200 e 1500pb.

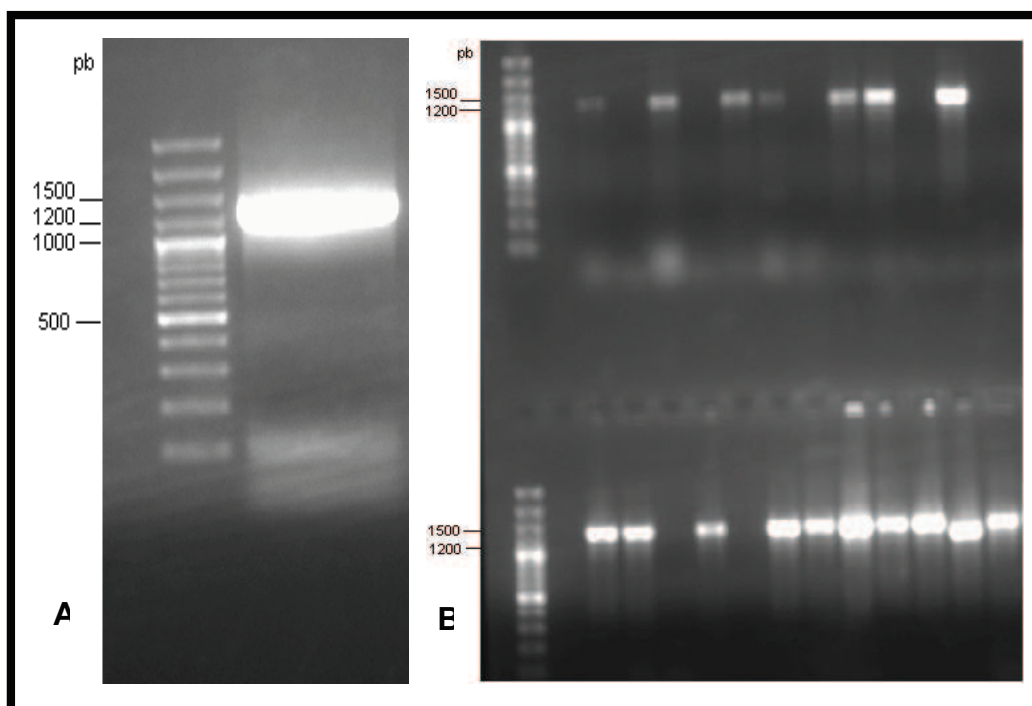


FIGURA 16 - CLONAGEM DA PROTEÍNA COMPLETA. (A) Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto de RT-PCR para proteína completa. A altura do produto encontra-se em aproximadamente 1200pb. (B) PCR de colônia da transformação em DH5- $\alpha$  eletrocompetente. Clones positivos encontram bandas também na altura entre 1200pb-1500pb

Esta banda foi ligada em plasmídeo de clonagem pET-14b e transformada em bactérias DH5 $\alpha$  eletrocompetentes. Fazendo a reação de PCR de colônia foram encontradas várias colônias positivas, que apresentaram bandas entre 1200-1500pb. Escolhidas três colônias, o produto da “mini preparação” destas foi sequenciado em sequenciador automático. As seqüências de ótimas qualidades foram analisadas em *software* adequado e o resultado da sobreposição das seqüências está na FIGURA 17 demonstrada adiante.

Analisando a seqüência deduzida da hialuronidase de *L.intermedia*, pode-se constatar que a proteína contém 400 aminoácidos e os primeiros 19 são resíduos hidrofóbicos que formam o peptídeo sinal de endereçamento para o retículo (FIGURA 17). Segundo o programa *Protparam* esta proteína possui massa molecular aproximada de 46.1KDa, ponto isoelétrico de 8.66 e cinco possíveis sítios de N-glicosilação estão presentes, os quais estão representados dentro de retângulos na FIGURA 17.



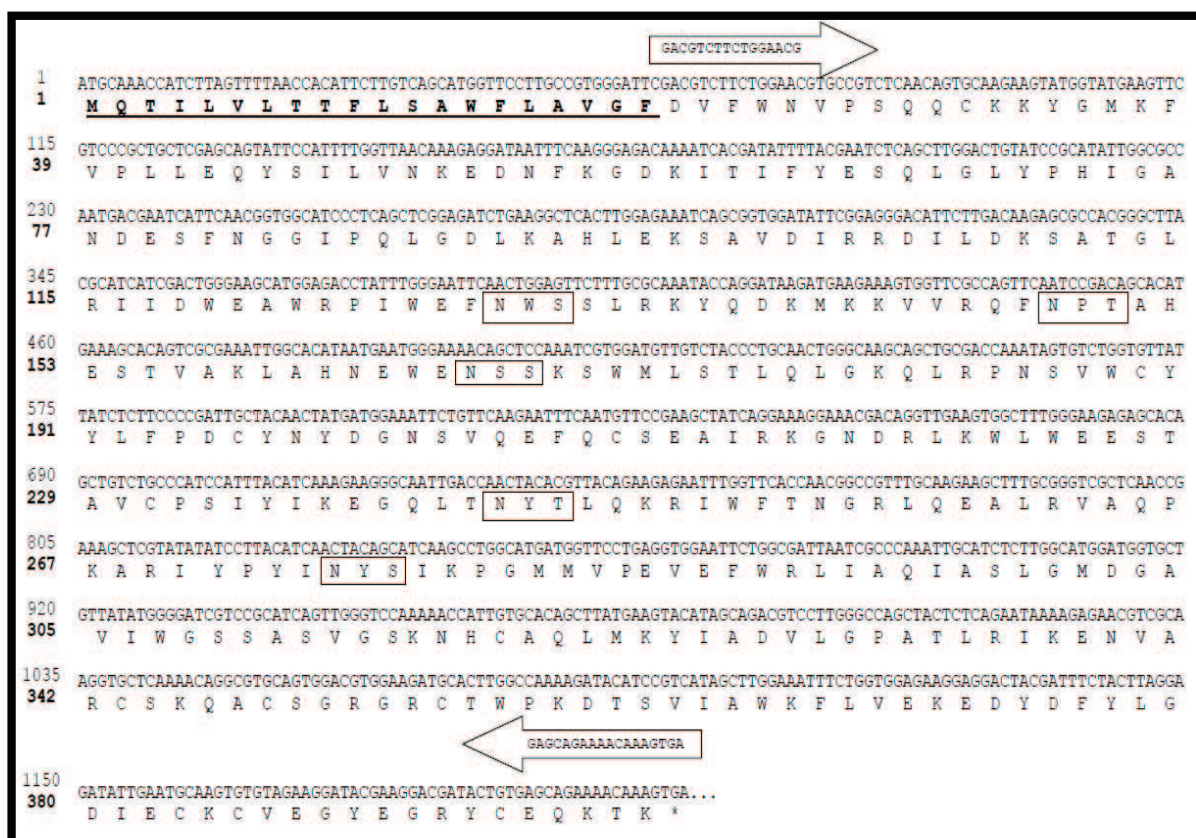


FIGURA 17 - SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS E AMINOACÍDICAS DE HIALURONIDASE DE *L. intermedia*. A sequência específica dos primers para a subclonagem molecular estão dentro das setas. A sequência sublinhada representa o peptídeo sinal de endereçamento para o retículo endoplasmático e dentro dos retângulos se encontram possíveis sítios de N-glicosilação.

Segundo o banco de dados *Pfam* a hialuronidase de *L. intermedia* encontrada pertence ao Clã *Glyco hydro tim* e família *Glyco hydro 56*, a qual compreende um amplo grupo de enzimas O-glicosil hidrolases. A estrutura terciária deste clã é melhor conservada do que sua sequência aminoacídica em si, não sendo identificada uma assinatura no *Pfam*. O sistema de classificação das glicosil hidrolases baseado na similaridade de sequência tem levado à definição de 85 diferentes famílias. Esta classificação é acessada no CAZy (“*Carbohydrate-Active EnZymes*” - *Pubmed*). A família *Glyco hydro 56* apenas compreende enzimas com atividade conhecida de hialuronidases (GMACHL; KETTER; KREIL, 1993).

Alinhando a sequência obtida para *L. intermedia* com outras sequências de alta similaridade obtidas pelo *Blastx* temos o perfil apresentado na FIGURA 18.

Cerastes cerastes	1	-----MYHIWIKFLA-----AWIFLKKFNGVHMQAK
Echis_pyramidum	1	-----MYHIWIKFLA-----AWIFLKKFNGVHMQAK
Bos_taurus	1	-----MGMRFRHHISFSFAGSSGTPQAVFTFLPCCALDFRA
Salmo_salar	1	-----MYWTALPDWKVLLIV-----TLLWDCCFCAEEKPTR
Xenopus_laevis	1	-----MPCCLTFLWLFLG-----AAANAQLSDSWMNKPTF
Mus_musculus	1	MLGLTQHAQKVWRMKFSPEVSPGSSPATAGILLR-----ISTIFLTLLELAQVCR
Rattus_norvegicus	1	-----MKPFSPEVSPDPCPATAAILLR-----TYTIFLTLLELAQGCR
Sus_scrofa	1	-----MAAILLP-----ICTIFLNLLSVAQGSR
Mesobuthus_martensii	1	-----
<u>L_intermedia</u>	1	-----MQTILVITTFLL
Cerastes_cerastes	28	APMYRNEPFLVFWNAPTQCCR-LRYKVDLD--LKTEHIVSNANDSLSGSAVTIFYPNHLG
Echis_pyramidum	28	APMYRNEPFLVFWNAPTQCCR-LRYKVDLD--LKTEHIVSNANDSLSGSAVTIFYPNHLG
Bos_taurus	41	PPLISNFSFLWAWNAPVERCVNREFQTFPD--LRLESVKGSFCKSATGQFTIFYADRLG
Salmo_salar	33	WPLYFQKPLVIAWNAPTEDCG-ERHSHFQ--LECFQIVASENEGQVFNLTIFYKDRLG
Xenopus_laevis	31	RPVETRRPFIIAWNAPTQDCP-FRETFVHLD--LKLEEDINASENEGQVFNLTIFYKERRLG
Mus_musculus	52	GSVVSNRPFITVWNGTTHWCL-TEYGVVDV--VSVEVDVANKEQSGGNNMTIFYREELG
Rattus_norvegicus	39	GSVVSNRPFITVWNAATHWCL-RDHGVVDV--VSVEVDVANKEQSGGNNMTIFYREELG
Sus_scrofa	24	DPVVENRPFTTIWNAATHWCL-KRRGVVDV--VSVEVDVANKEQSGGNNMTIFYREELG
Mesobuthus_martensii	1	-----DFKVVWEVPSIMCS-KKEKINVTDLTSHRILVNQEBETENGDKTIFYESQLG
<u>L_intermedia</u>	12	SAWFLAVGFDVFWNVPSQCC--KKYGMKFVPLEQ--SILVNKEDNFGDKTIFYESQLG
Cerastes_cerastes	85	VYRHIDDR-GHFFHGLIPONESLTRHLNKSQSDINRIPLKRFHGLVIDWENWRPQWIR
Echis_pyramidum	85	VYRHIDDR-GHFFHGLIPONESLTRHLNKSQSDINRIPLKRFHGLVIDWENWRPQWIR
Bos_taurus	99	YYPHIDEKTGKTVEGGIPOLGNLKSHEKAKNDIAYIIPNDSVG-LAVIDWENWRPQWIR
Salmo_salar	90	LYPYDSEFDGTAMNGGLPQVASIAQHLEKMPEGIQYYIREPGAKGLAVIDWEWRPQWIR
Xenopus_laevis	88	MYPYDSEHGG-FVAGGLPONASIRAHLEKLEPEGIQYIRSRDRDGLAVIDWEWRPQWIR
Mus_musculus	109	TYPYTPT-GEFVEGGLPONASIVTHLAHTFDIKAAPEPTFSGLAVIDWEAWRPWAF
Rattus_norvegicus	96	TYPYTPT-GEFVEGGLPONASIVTHLAHAFCDIKAAPEPTFSGLAVIDWEAWRPWAF
Sus_scrofa	81	TYPYTSA-GEFVEGGLPONASIDVHLNRTFDILAAPESNFSGLAVIDWEAWRPWAF
Mesobuthus_martensii	53	KYPHIS--GI--NGGLOVSTIANHFKIARDNIS--IPDPNENGVTIDWEAWRPWAF
<u>L_intermedia</u>	70	LYPHIGAN-DESFNGGLPOLGLKAHLEKSAVDIR--DILKKSATGLAVIDWEAWRPWAF
Cerastes_cerastes	144	NWGSKNVYRNRSIQFARDLHPQLSEDKIRRIANKEVEEKAASKFMROTLLLEEMRPTGYW
Echis_pyramidum	144	NWGSKNVYRNRSIQFARDLHPQLSEDKIRRIANKEVEEKAASKFMROTLLLEEMRPTGYW
Bos_taurus	158	NWPKDVYRDSVELVLQKNPQLSFPEASKIAVDFETAGKSEMOTLKLKLLRPNHLW
Salmo_salar	150	NWDFKDVYRRRSQQLVAEKNLAWPAERVAKVAQCFEEMSARKFMLETLRLAKSLRPNQLW
Xenopus_laevis	147	NWQTKNVYRNRSRNLVASRHEBSWSREQVEKESLYDFENAAEFEMMETLRHAKTTRRQLW
Mus_musculus	168	NWLSKDIYQORSMELVQAHEHPWFETIVEAAANQCFQEAASAMMAGTLQLGQVLRPGLW
Rattus_norvegicus	155	NWLSKDIYQORSMELVQAHEHPWFETIVEAQAQDQCFQEAQAAMMAGTLQLGQVLRPGLW
Sus_scrofa	140	NWDAKDIYRORSRALVQKHPPWPAPVVEAAQDQCFQEAACIWMAGTLKLQVLRPGLW
Mesobuthus_martensii	111	NWGRMSBYRDRSKDLVAKHPDWSFACTEKVAIEEWENSASKEWMLTFLKLAEIDMRPNARW
<u>L_intermedia</u>	129	NWSSLRRYQDMKKVVEQFNPTAHESTVAKLAHNEWENSSSKSWMLSTLQLGQLRPNVW
Cerastes_cerastes	204	GYLYSDCCNYDYKTKGIDQYTGKCPETEMSRNDOLLWLWRSTALFENVYLEIILRSSDN
Echis_pyramidum	204	GYLYSDCCNYDYKTKGIDQYTGKCPETEMSRNDOLLWLWRSTALFENVYLEIILRSSDN
Bos_taurus	218	GYLYFPDCYNHNHNP--TYNGNCPDVEKRRNDLLEWLWKESTALFENVYINIRLKTQN
Salmo_salar	210	GYLYFPDCYNHDYRNTLENYTGCPDVEVARNEMLWLWTESTALFENVYSTVLRSSPS
Xenopus_laevis	207	GYLYFPDCYNHDYIKNRESYTGCPDVEISRNDOLSWLWKESTALFENVYIQLRRLT
Mus_musculus	228	GYGFPPDCYNNDELSL--NYTGCCPVEFVRDQNDOLSWLWNCSTALFENVYIPLAALMCTEK
Rattus_norvegicus	215	GYGFPPDCYNYDELSP--NYTGCCSLSIHDQNDOLSWLWNCSTALFENVYIPLAALMCTEK
Sus_scrofa	200	GYGFPPDCYNYDEQSS--NYTGCCPGVSAQNDOLSWLWGCSTALFENVYIPLAALMCTEK
Mesobuthus_martensii	171	CYLYFPDCYNYGGKDQSEYF--CKNDIQEANDKLSWLWKESTALFENVYIPLAALMCTEK
<u>L_intermedia</u>	189	CYLYFPDCYNYG-NSVQEFQ--CSAIRKGNDRLEWLWKESTALFENVYIPLAALMCTEK
Cerastes_cerastes	264	ALK---FVHHRIKEAMRIASMAREDYALPVFERYARPFYAY-TFEPLAQEDLVTTVGETAA
Echis_pyramidum	264	ALK---FVHHRIKEAMRIASMAREDYALPVFERYARPFYAY-TFEPLAQEDLVTTVGETAA
Bos_taurus	276	AAL---VVRNRVQEATRIKIASVESHELPEVYARPFYETDGSSTYLSQGDVNSVGEIVS
Salmo_salar	270	GRQ---FVRNRVKEGMRLAS--GGGLARPVFERYARPFYAN-VLDLLETDLVSTIGESAA
Xenopus_laevis	267	GRK---FVRSRVQEAMRIASRHHKDYSLPEVYETDGSSTYLSQGDVNSVGEIVS
Mus_musculus	286	SQM---VVRNRVQEALRVAVSRDPH--VPVMPYVQIFYEM-ADYLLPLEELEHSLGESAA



Rattus norvegicus	273	SQM---YVRVRCFAFRALVSRI PH-V PMPYVQIFYEK-TDYLLFLEEIEHSTIGESAA
Sus scrofa	258	TQL---YVQHRVNEAFVAAAAGLPN-LPVLIPYAQIFHDM-TNRLLSFEIEHSTIGESAA
Mesobuthus martensii	229	TSQRAWVYARIRERIRLSHPN-----TLLTPYINYLPG-TKKTVFSMDFKRVLGQIGS
<u>L intermedia</u>	246	LQKRIWFTNGRLQALRVQA-----PKARTYPYINYSIKPG--MNVPEVFWRLTAQIAS
Cerastes cerastes	320	MGAAGIVSWGSMQYASTVDSCKVKKYMNGLGRIYIVNVTTAAKLC SRVLCRKNGRCVRK
Echis pyramidum	320	MGAAGIVSWGSMQYASTVDSCKVKKYMNGLGRIYIVNVTTAAKLC SRVLCRKNGRCVRK
Bos taurus	333	LGAAGIIMWGSLNLSLVQSCMNGTYLNTTLNPIIINVTTAAKMC SQVLCHDGGVCTRK
Salmo salar	325	LGAAGIIMWGSDHAYAGSKTSCEFSNEYLQGFGLGRYLLNVSTAAELCSQRLCGSGRCRR
Xenopus laevis	323	QGAAGVIVWGDAEYTKSKETCOMTKRYLEEDLGRYIVNVTTAAELCSQSCLNGNGRCIRQ
Mus musculus	341	QGAAGVIVWLSSDKTSTKESCOATKAYMDSTLGPFIIVNVTSAAELCSEALCSGHRGRCVRH
Rattus norvegicus	328	QGAAGVIVWLSSDKTSTKESCOATKAYMDSTLGPFIIVNVTSAAELCSEALCSGHRGRCVRH
Sus scrofa	313	QGAAGVIVWISWENTRTKESCSSTREYVDTTLGPFIIVNVTSAAELCSEALCSGHRGRCVRH
Mesobuthus martensii	283	LGLLGATWGSSTYHVNTSGMCKEMKTYVKDVIAPVASTVIQNVNRCSSQCKGRCNCVWF
<u>L intermedia</u>	299	LGMIGAVIWGSSASVGSKNHCACIMKYHADVLGPATLRKENVARCSKQACSGRGRCWTP
Cerastes cerastes	380	HSDSNAFLHLFPESERIMVYANATEK-KVIVKGRTELENIYIRENFMCCYQGWNG---
Echis pyramidum	380	HSDSNAFLHLFPESERIMVYANATEK-KVIVKGRTELENIYIRENFMCCYQGWNG---
Bos taurus	393	HWNSDYHLHNPMMNEAIQTGEGG---KYTVPGTLLLEDLQKFSDTFYCSYCNLSCK--
Salmo salar	385	HPDIDAYLHLSPLEHSIVSLENGKFN--VQTLGCLGEEDIMGFQREFQCCYSGHQEGGC
Xenopus laevis	383	DNITDAFLHLSANFQIVSAPKDSQGP8LRAEGTSAEDIAVIRSCFRCCYVIVWGDSC
Mus musculus	401	PSYFEALTLNPSSESIEIETHDGRPP---SLKGTLSLKDRACQAMMFRRCRCYRGWNG---
Rattus norvegicus	388	PSYFEALTLNPSSESIEIETHDGRPL---SLKGTLSLKDRACQAMMFRRCRCYRGWNG---
Sus scrofa	373	PSHTEALFILNPSSESIEKPTPGGGPL---TLQGLSLKDRVQMAEEFQCCYEGWNG---
Mesobuthus martensii	343	EEPYTSWKYLIDP-----KNPTFKHTNISCKCKGGVGTG---
<u>L intermedia</u>	359	KDTS-----VIAWKFELVEK-----EDYDFYLGDIIECKVEGEG---
Cerastes cerastes	436	-----LYCEEYSKDIRKI--
Echis pyramidum	436	-----LYCEEYSKDIRKI--
Bos taurus	447	---KRVDIKNVHSVDVCMREDVCI DAFLKPP-
Salmo salar	443	GQRDPLQQRGIAPSVMGTVVHCLLLLLLTL
Xenopus laevis	443	GFQRTNGGAVATGPGGIVLVVSTVALILALL
Mus musculus	455	-----KNCIKRGV-----
Rattus norvegicus	442	-----ENCKKQDM-----
Sus scrofa	427	-----TWCEQQGTR-----
Mesobuthus martensii	376	-----RYCQIAP-----
<u>L intermedia</u>	393	-----RYCEQKTK-----

FIGURA 18 - SIMILARIDADE DE HIALURONIDASE DE *L. intermedia* COM HIALURONIDASES DE OUTRAS ESPÉCIES. O alinhamento foi obtido através do site <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> e o sombreamento através da ferramenta [http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Em preto os aminoácidos conservados e em cinza substituições conservativas. As seqüências comparadas foram: ABI33939.1, ABI33941.1, AAP55713.1, ACI33947.1, EDL77243.1 AAL55823.1, AAC15949.1, ACH56985.1 e ACY69673.1

TABELA 6 – IDENTIDADE AMINOACÍDICA ENTRE HIALURONIDASE DE *L.intermedia* E HIALURONIDASES DE OUTRAS ESPÉCIES

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
(1) <i>L.intermedia</i>		33	33	30	31	28	31	31	46	31
(2) <i>C. cerastes</i>			99	40	41	41	37	38	31	37
(3) <i>E.pyramidium</i>				40	41	41	37	38	31	37
(4) <i>B. taurus</i>					40	38	34	37	30	34
(5) <i>S.salar</i>						50	34	39	30	36
(6) <i>X.Laevis</i>							39	43	30	40
(7) <i>M.musculus</i>								70	31	88
(8) <i>S.scrofa</i>									32	70
(9) <i>M.martensii</i>										33
(10) <i>R.novergicus</i>										

NOTA: Os números de 1-10 na primeira linha da tabela correspondem às espécies indicada na primeira coluna. Os números que não estão em negrito dizem respeito ao Score de positividade obtido pelo alinhamento em < <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>>

Pode-se constatar através da FIGURA 17 que a hialuronidase da aranha marrom em estudo possui identidade com espécies de diversos gêneros, entre eles os de escorpião (*Mesobuthus martensii*), “vertebrados ósseos” (*Salmo salar*, *Cerastes cerastes*, *Echis pyramidum leakey* e *Xenopus laevis*) e mamíferos (*Sus scrofa*, *Bos taurus*, *Mus musculus* e *Rattus norvegicus*).

Através do score do alinhamento da sequência protéica da hialuronidase de *L.intermedia* com hialuronidases das espécies descritas anteriormente pode-se dizer que esta enzima possui maior conservação de aminoácidos com as espécies de escorpião (*Mesobuthus martensii*) e serpentes (*Cerastes cerastes*, *Echis pyramidum leakeyi*), como demonstrado na TABELA 6.

## 5.6 SUBCLONAGEM DO cDNA DA HIALURONIDASE DE *L. intermedia*

Os estudos de caracterização de hialuronidases de venenos até o momento provêm principalmente da purificação destas enzimas através do veneno bruto por cromatografia em resina de sepharose, o que depende geralmente de várias etapas cromatográficas e de uma grande quantidade de veneno (NAGARAJU; DEVARAJA; KEMPARUJO, 2007; MAGALHÃES; da SILVA JUNIOR; ULHOA, 2008; GAO; GOPALAKRISHNAKONE, 2008).

Como discutido anteriormente, não se obtém uma massa muito grande de proteínas de veneno de *L. intermedia* e, é relatado que, hialuronidases representam uma porcentagem bastante baixa do que é expresso pela glândula de veneno da

aranha (dos SANTOS *et al.*, 2000; da SILVA *et al.*, 2004; FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008).

Levando esses empecilhos em consideração, obter a clonagem e expressão heteróloga desta toxina é ideal e com este intuito, baseado na sequência completa obtida anteriormente foram desenhados dois oligonucleotídeos contendo sítios para enzimas de restrição: Sense Hya madura 5'- GGA ATT CCA TAT GGA CGT CTT CTG GAA CG-3' e Antisense Hya madura 5'- CGG GAT CCC TCA CTT TGR TTT CTG CTC-3' (representados dentro de setas na FIGURA 17). Para a subclonagem desta enzima foi também escolhido o plasmídeo pET-14b.

O porquê da escolha do pET-14b como vetor de clonagem, as vantagens e desvantagens dos sistemas procarióticos foram discutidos anteriormente no tópico 5.3, mas desta vez as enzimas escolhidas foram NdeI e BamHI. O motivo da troca da enzima no oligonucleotídeo sense de XhoI para NdeI foi o reconhecimento da sequência da hialuronidase pela XhoI. Assim, o inserto seria degradado se incubado com esta enzima. O perfil de reação do PCR com estes iniciadores foi semelhante ao demonstrado na FIGURA 16.

Diversas condições de digestão e ligação foram testadas segundo Sambrook e Russel (2001) e manuais dos fornecedores. Sendo padronizado a digestão simples (uma enzima de cada vez) à 37° por 16h e a ligação à 16°C por 16h. O PCR do produto da ligação apresentou banda na altura entre 1200-1500pb (FIGURA 18A), indicando que a ligação inserto-vetor havia ocorrido. Este produto foi transformado em DH5- $\alpha$  eletrocompetentes e as colônias foram testadas por PCR. O único clone positivo apresentou banda na altura esperada (FIGURA 19B) e foi submetido à seqüenciamento automático.

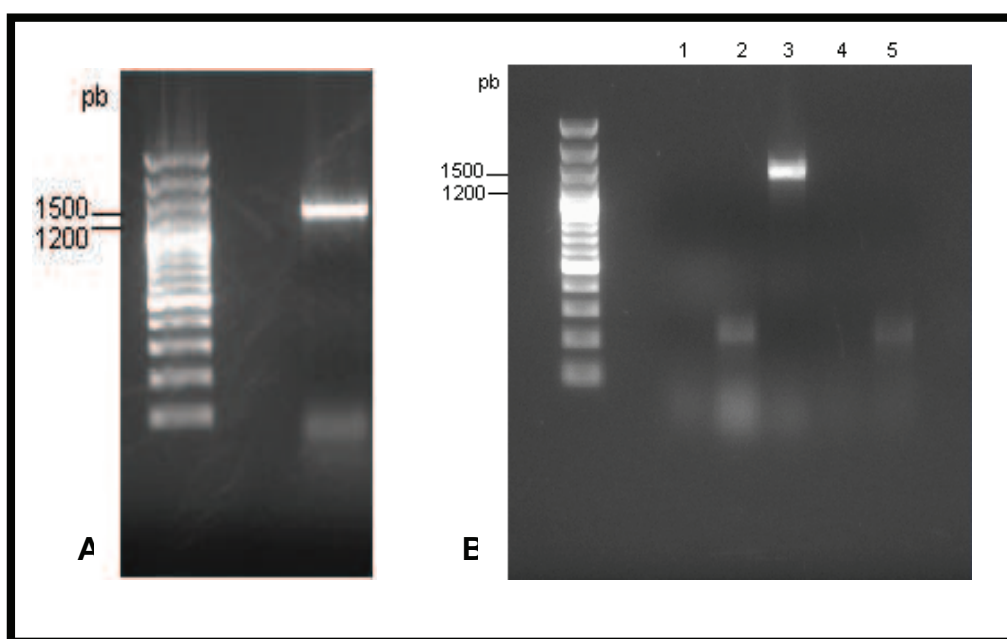


FIGURA 19 – SUBCLONAGEM DA HIALURONIDASE DE *L. intermedia*. (A) PCR da ligação utilizando primers universais. Pode ser visualizada uma banda entre 1200-1500pb, indicando que a ligação ocorreu. (B) PCR de colônia de 5 clones de DH5- $\alpha$  testados após eletroporação com a construção resultante da ligação da proteína madura. Em 3 temos um clone positivo com banda na altura desejada, o qual, foi analisado por sequenciamento

A análise dos eletroferogramas revelou que a sequência não havia sofrido nenhuma troca de nucleotídeo durante os ciclos de amplificação e que esta se encontrava na fase de leitura correta. Com esta informação a “mini preparação” deste plasmídeo foi realizada e utilizada para transformação das cepas de expressão.

Não existe um consenso na escolha dos plasmídeos de expressão para hialuronidases recombinantes e as condições de expressão são também bastante variáveis. Geralmente a quantidade de indutor e temperatura utilizados não são relatados e o tempo de expressão, quando relatado, é de 4-5h. Na maioria dos estudos a enzima é expressa em corpos de inclusão e depois dobrada em condições nativas para purificação (HINESS; FERRETTI, 1988; SOLDATOVA *et al.*, 1998; SCOV *et al.*, 2006; HOFINGER *et al.*, 2007)

Inicialmente a cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS foi escolhida. Embora seja uma das cepas mais simples, ela possui o plasmídeo pLysS que reprime a expressão basal anterior à adição do indutor à cultura (NOVAGEN *pET System Manual*, Edição 11), sendo adequada para a verificação de expressão.

O teste de mini-expressão foi realizado a 30°C em diferentes concentrações do indutor IPTG: 0,1mM; 0,2mM; 0,4mM e 1mM e foram coletadas frações da cultura nos tempos de 0h; 0,5h; 1h; 2h; 3h; 4h e 5h.

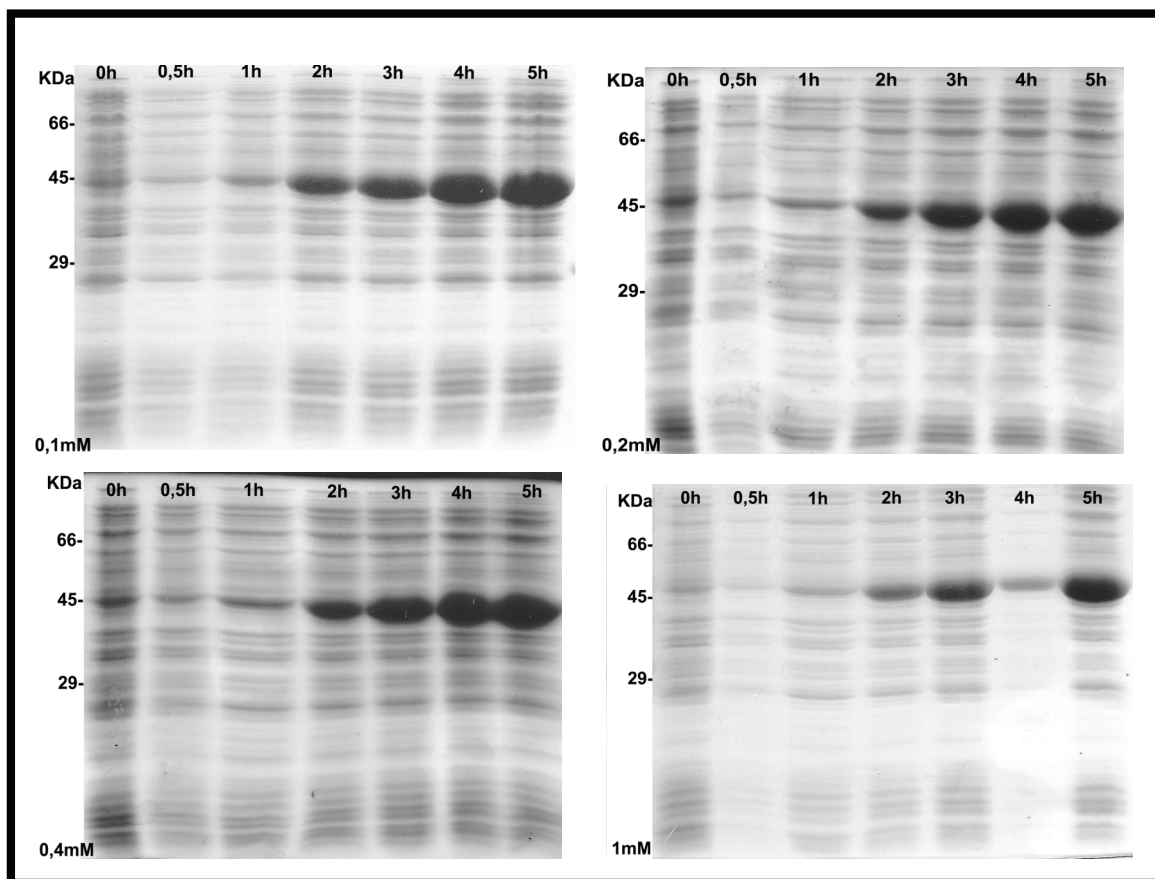


FIGURA 20 - TESTE DE INDUÇÃO PARA EXPRESSÃO DE HIALURONIDASE DE *L.intermedia* EM BL21(DE3)pLysS. A proteína foi expressa a 30 °C, em diferentes concentrações de IPTG (0,1; 0,2; 0,4 e 1,0 mM) e tempos (0; 0,5; 1; 2; 3; 4 e 5 horas). Em cada gel estão indicadas as massas moleculares, os tempos e a concentração de IPTG.

Conforme demonstrado na FIGURA 20, onde uma banda na altura de 45KDa fica mais intensa com o passar do tempo, a proteína foi expressa em todas as concentrações teste e pode-se afirmar com certeza que a partir de 1h a proteína é expressa em quantidades detectáveis pelo corante Azul de *Comassie*. No tempo de 0h e 0,5h de expressão a banda possui intensidades parecidas e não se pode saber se é uma proteína bacteriana na mesma altura que a recombinante ou se há um vazamento de expressão no tempo de 0h (o que não seria esperado em cepa pLysS). Embora em 4h e 5h há uma expressão em maior quantidade da proteína, o tempo escolhido para a expressão foi de 3,5h. Pois neste tempo existe uma



quantidade razoável de proteína, mas não em uma concentração excessiva, o que favoreceria a formação de corpos de inclusão.

Como em 0,1mM o perfil de expressão é parecido com as concentrações superiores testadas, foi feito o teste de expressão com a concentração de 0,05mM visando um menor sobrecarga da maquinaria de expressão bacteriana o que poderia ajudar na solubilidade da proteína recombinante. A FIGURA 21 demonstra que houve uma expressão semelhante às demais na concentração de 0,05mM de indutor.

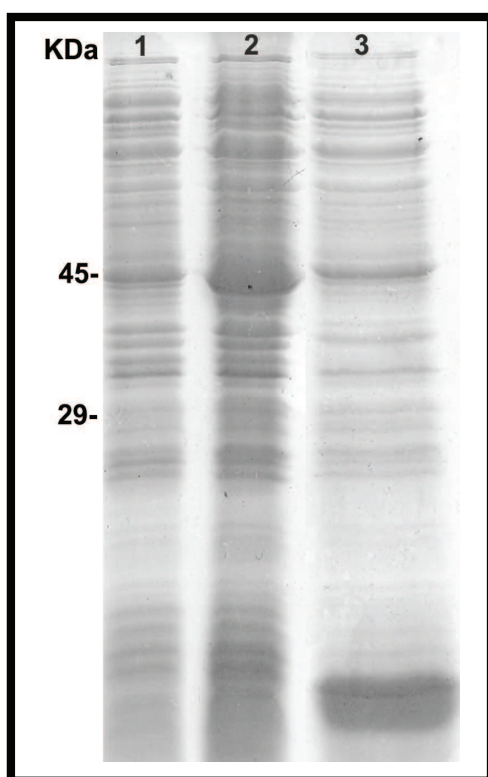


FIGURA 21 - TESTE DE INDUÇÃO PARA EXPRESSÃO DE HIALURONIDASE DE *L.intermedia* EM BL21(DE3)pLysS. A proteína foi expressa a 30 °C por 3,5h na concentração de 0,05mM de indutor. Em 1 tem-se uma alíquota representativa da cultura antes da indução, em 2, três horas e meia depois da indução e em 3 o sobrenadante da cultura depois da lise bacteriana.

Tendo padronizados a quantidade de indutor e tempo de expressão, o estudo se voltou para verificação da solubilidade da proteína. Neste, é verificado se a proteína está entre as proteínas do sobrenadante depois que a cultura bacteriana é lisada e centrifugada. Na expressão a 30°C pode-se verificar que a proteína recombinante com 0,05mM era expressa, mas não estava solúvel (FIGURA 21). Assim como para 0,05mM; para as demais concentrações foi realizado o mesmo procedimento e visto que a expressão estava sendo em corpos de inclusão.

Segundo Sambrook e Russel (2001) o intervalo de temperatura entre 20-37°C deve ser testado para genes sobre o controle do promotor T7, como é o caso do pET-14b.

A temperatura de expressão foi diminuída a 22°C para que o metabolismo bacteriano fosse diminuído, o que poderia favorecer a solubilidade da hialuronidase. Porém, um perfil semelhante ao da FIGURA 21 foi obtido até mesmo quando os testes foram realizados nas temperaturas de 20°C e 16°C. Antes de tentar condições de renaturação da proteína insolúvel, foi optado pela mudança da cepa bacteriana de expressão.

Dentre algumas opções no laboratório a cepa escolhida foi *E. coli* AD494(DE3), a qual é derivada da cepa K12 com mutação no gene da tioredoxina redutase (*trxB*), favorecendo a formação de pontes dissulfeto e assim o dobramento protéico (Novagen *Competent cells*, 2002), pois hialuronidases de venenos de alguns insetos são relatadas possuírem pontes dissulfeto (CSÓKA *et al.*, 2004; SKOV *et al.*, 2006).

Um novo teste de indução foi realizado a 30°C nas concentrações de 0,05mM, 0,1mM, 0,2mM e 0,4mM de indutor coletando alíquotas nos tempos de 0h; 0,5h; 1h; 2h; 3h; 4h e 5h. A proteína foi expressa em todas as concentrações teste e a partir de 0,5h, porém em menor quantidade que em BL21(DE3)pLysS (FIGURA 22).

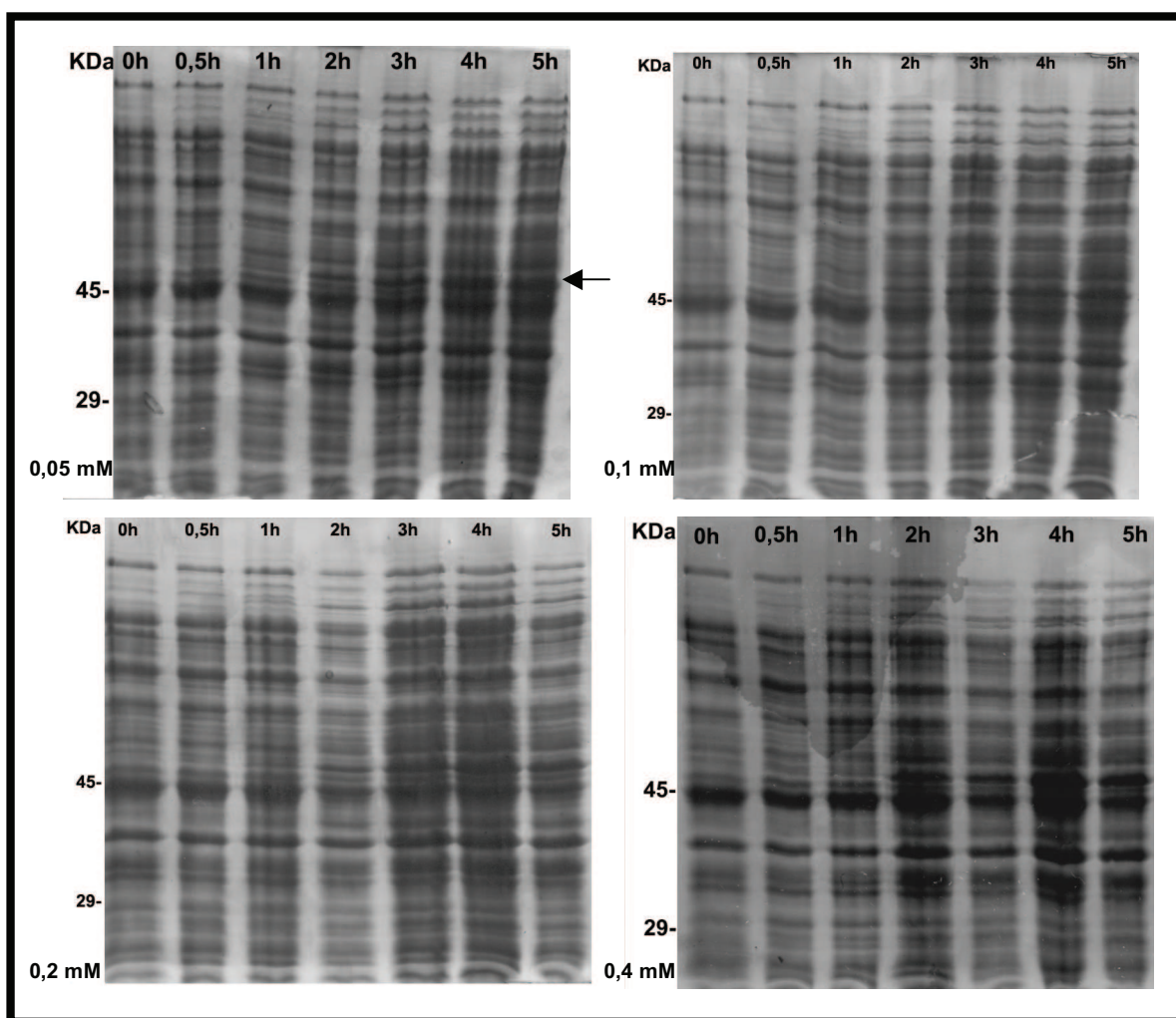


FIGURA 22 - TESTE DE INDUÇÃO PARA EXPRESSÃO DE HIALURONIDASE DE *L.intermedia* EM AD494(DE3). A proteína foi expressa a 30 °C, em diferentes concentrações de IPTG (0,05; 0,1; 0,2 e 0,4 mM) e tempos (0; 0,5; 1; 2; 3; 4 e 5 horas). Em cada gel estão indicadas as massas moleculares, os tempos e a concentração de IPTG. Na ponta da seta a indicação da altura da proteína recombinante

Pôde-se notar que a expressão da proteína recombinante não foi em tão grande quantidade como em BL21 (FIGURA 20). A solubilidade da proteína recombinante foi avaliada para cada concentração testada. Nesta avaliação foi percebido que existe uma porção da enzima recombinante na fração solúvel, conforme demonstrado na FIGURA 23.



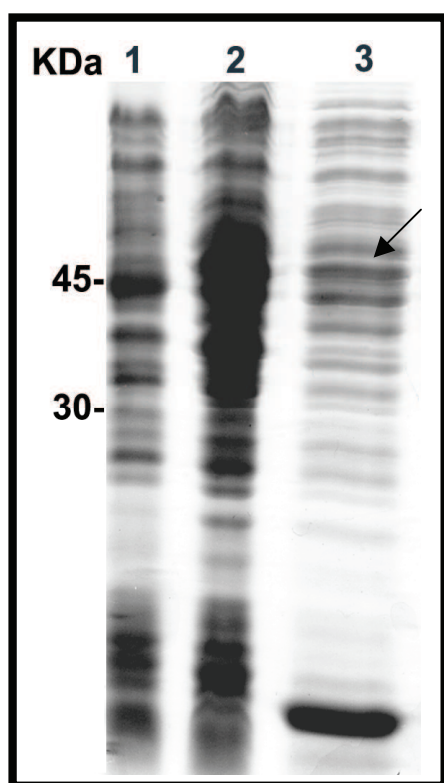


FIGURA 23 – TESTE DE SOLUBILIDADE DE HIALURONIDASE DE *L.intermedia* EM AD494(DE3). A proteína foi expressa a 30°C, em diferentes concentrações de IPTG (0,05; 0,1; 0,2 e 0,4 mM) por 5 horas. A cultura foi ressuspensa em tampão de ligação e após sonicação o sobrenadante do lisado foi avaliado. A figura demonstra a concentração escolhida para expressão: 0,05mM. Em 1 tem-se a cultura no tempo antes da indução, em 2, cinco horas depois da indução e em 3 o sobrenadante do lisado. Na seta a indicação da proteína recombinante entre as proteínas solúveis bacteriana.

Visto que em todas as concentrações a proteína recombinante é expressa e uma parte desta é solúvel, foram escolhidas como condições de expressão a concentração de 0,05mM de IPTG por um tempo de 4h. E embora já em 30°C houve solubilidade da proteína, outras temperaturas (inferiores a 30°C) podem ainda ser testadas.

## 6 CONCLUSÃO

Durante o trabalho desenvolvido durante o mestrado foi possível obter a clonagem e seqüenciamento de duas novas toxinas do veneno de *Loxosceles intermedia*. Uma delas, uma proteína que não possui atividade enzimática, sendo relatada na literatura como alérgeno, e outra, uma enzima com atividade hidrolítica, hialuronidase. Com a identificação da sequência destas toxinas pôde-se observar que ambas possuem massa molecular teórica de aproximadamente 46KDa e no início de suas sequências possuem resíduos hidrofóbicos de um peptídeo sinal de endereçamento para o retículo endoplasmático. Até o momento na literatura se tinha o relato apenas de quatro sequências nucleotídicas parciais de alérgeno e uma sequência parcial de hialuronidase de espécies de aranha.

Comparando a sequência destas toxinas com bancos de dados protéicos foi visto que possuem identidade com proteínas correspondentes de outras espécies animais. Foi constatado que o alérgeno pertence à família de proteínas ricas em cisteína (CAP), a qual abrange proteínas de diversas funções. Já a hialuronidase pertence à família *Glyco hydro 56*, uma família em que se enquadram até o momento apenas hialuronidases.

Foi possível obter a subclonagem destas toxinas em plasmídeo pET-14b. Para o alérgeno foi conseguida a subclonagem com a sequência que contém incluso o peptídeo sinal. Para a hialuronidase foi obtida a subclonagem da proteína madura e com a expressão desta construção em *E. coli* AD494(DE3) foi obtida uma fração desta enzima expressa na sua forma solúvel.

A perspectiva deste trabalho é que a construção obtida na subclonagem do alérgeno seja útil para observar condições prévias de expressão heteróloga e solubilidade desta proteína até que se obtenha a subclonagem da toxina madura. Quanto aos resultados obtidos com a hialuronidase espera-se que a solubilidade da enzima nas condições de expressão padronizadas em AD494(DE3) repita-se em cultura de grande escala, para que assim se possa purificar esta toxina e desenvolver os estudos de sua caracterização bioquímica e biológica.

## REFERÊNCIAS

AALBERSE, R.C Structural biology of allergens. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.106, p.228–38, 2000.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. Quarta Edição. Porto Alegre: Artmed, 2004.

ANDERSON, P. C. Spider bites in the United States. **Dermatologic clinics**, v. 15, p. 307-312, 1997.

ANDRADE, R.M.G.; OLIVEIRA, K.C.; GIUSTI, A.L.; SILVA, W.D.; TAMBOURGI, D.V. Ontogenetic development of *L. intermedia* spider venom. **Toxicon**, v. 37, p.627-632, 1999.

APPEL, M.H.; DA SILVEIRA, R.B.; GREMSKI, G.; VEIGA, S.S. Insights into Brown spider and loxoscelism. **Invertebrate survival journal**, Italy, v. 2, p. 52-158, 2005.

ARLIAN, L.G. Arthropod allergens and human health. *Annu Rev Entomol.* v.47, p. 395-433, 2002.

BARBARO, K. C., EICKSTEDT, V. R.; MOTA, I. Antigenic crossreactivity of venoms from medically important *Loxosceles* (Araneae) species in Brazil. **Toxicon** , v. 32, p. 113-120, 1994(b).

BARBARO, K. C.; KNYSACK, I.; MARTINS, R.; HOGAN, C.; WINKEL, K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas **Toxicon**, v. 45, p. 489-499, 2005.

BARBARO, K.C.; CARDOSO, J.L.C.; EICKSTEDT, V.R.D.; MOTA, I. Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucho* spider venom. **Toxicon**, v. 30, p. 331-338, 1992.

BARRETO, O.C.O.; CARDOSO, J.L.C.; de CILLO, D. Viscerocutaneous form of loxoscelism and erythrocyte glucose-6-phosphate deficiency. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 27, p. 264-267, 1985.

BILÓ, B.M.; RUEFF, F.; MOSBECH, H.; BONIFAZI, F.; OUDE-ELBERINK, J.N. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. EAACI Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. **Allergy**, v.60(11), p.1339-49, 2005.

BONIFAZI F.; JUTEL M.; BILÓ B.M.; BIRNBAUM J.; MULLER U. Prevention and treatment of hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice. **Allergy**, v.60(12), p.1459-70, 2005.

BORGES, J.P.; CULERRIER, R.; ALDON, D.; BARRE, A.; BENOIST, H.; SAUREL, O.; MILON, A.; DIDIER, A.; ROUGÉ, P. GATEWAY technology and E. coli recombinant system produce a properly folded and functional recombinant allergen of the lipid transfer protein of apple (Mal d 3). **Protein Expr Purif**, 2009.

BORRELLI, F.; ANTONETTI, F.; MARTELLI, F.; CAPRINO, L. The co-operative action of hyaluronidase and urokinase on the isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. **Thrombosis Research**, v.42, p.153–164, 1986.

BRAVO, L. M.; PURATIC, S.O.; BEHN, T.C.; FARDELLA, B.C.; CONTREPA, F.A. Estudio de la hemólisis inducida por veneno de *L. laeta*. Experiência *in vitro*. **Rev. Med. Chile**, v. 121, p.16-20, 1993.

BUCHERL, W. Biology and venoms of the most important South American spiders of the genera Phoneutria, Loxosceles, Lycosa, and Latrodectus. **Am Zool**, v. 9, p157-159, 1969.

BUCHERL, W. South American poisonous spiders and their poisons. **Arzneimittelforschung**, v.6, p 293-297, 1956.

BUCHERL, W. Aranhas do gênero Loxosceles e Loxoscelismo na América do Sul. **Mem Inst Butantan**, v.2, p. 20, 1960-62.

CABRERIZO, S.; DOCAMPO, P.C.; CARI, C.; ORTIZ DE ROZAS, M.; DÍAZ M, DE ROODT, A.; CURCI, O. **Arch Argent Pediatr**. v.107(3), p.256-8, 2009.

CAUGHEY, G.H. Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense. **Immunol Rev**, v.217, p.141-54, 2007.

CHAIM, O. M., SADE, Y. B., DA SILVEIRA, R. B., TOMA, L., KALAPOTHAKIS, E., CHAVEZ-OLORTEGUI, C., MANGILI, O. C., GREMSKI, W., VON

DIETRICH, C. P., NADER, H.; SANCHES VEIGA, S. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 211, p. 64-77, 2006.

CHAIN, E.; DUTHIE, E.S. Identity of hyaluronidase and spreading factor. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 21, p.324–338, 1940.

CHAVES-MOREIRA, D.; CHAIM, O. M.; SADE, Y. B.; PALUDO, K. S.; GREMSKI, L. H.; DONATTI, L.; DE MOURA, J.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DA SILVEIRA, R. B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. **J Cell Biochem**, 2009.

CHOMEZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**, v.15, p.532-534, 1993.

CIRINO, G., PEERS, S.H., FLOWER, R.J., BROWNING, J.L., PEPINSKY, R.B. Human recombinant lipocortin 1 has acute local anti-inflammatory properties in the rat paw edema test. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.86, p. 3428–3432, 1989.

COSTA, S.K.P.; ESQUISATTO, L.C.M.; CAMARGO, E.; GAMBERTO, A.; BRAIN, D.S.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Comparative effect of Phoneutria nigriventer spider venom and capsaicin on the rat paw oedema. **Life Sci.**, v. 69, p.1573–1585, 2001.

CRAMER, J.A.; BAILEY, L.C.; BAILEY, C.A.; MILLER, R.T. Kinetic and mechanistic studies with bovine testicular hyaluronidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1200, p.315–321, 1994.

da SILVA, P.H.; SILVEIRA, R.B.; APPEL, M.H.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, England, v. 44, p. 693-709, 2004.

da SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O. M.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Hyaluronidases in Loxosceles intermedia (Brown spider) venom are endo-beta-N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases. **Toxicon**, v. 49, p. 758-768, 2007b.

da SILVEIRA, R. B.; dos SANTOS FILHO, J. F.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; VON DIETRICH, C. P. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. **Toxicon**, v. **40**, p. 815-822, 2002.

da SILVEIRA, R. B.; WILLE, A. C.; CHAIM, O. M.; APPEL, M. H.; SILVA, D. T.; FRANCO, C. R.; TOMA, L.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Biochem J**, v. 406, p. 355-363, 2007a.

da SILVEIRA, R.B.; RIGOZZO, R.B.; CHAIM, O.M.; APPEL, M.H.; DREYFUSS, J.L.; TOMA, L.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom gland. **Biochimie**, v.88, p.1241–1253, 2006.

de CASTRO, C. S.; SILVESTRE, F. G.; ARAUJO, S. C.; GABRIEL DE, M. Y., MANGILI, O. C.; CRUZ, I.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, E. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon**, v.44, p. 273-280, 2004.

de MEDEIROS, C.R.; BARBARO, K.C.; LIRA, M.S.; FRANÇA, F.O.; ZAHER, V.L.; KOKRON, C.M.; KALIL, J.; CASTRO, F.F. Predictors of Bothrops jararaca venom allergy in snake handlers and snake venom handlers. **Toxicon**, v. 51(4), p. 672-80, 2008.

de OLIVEIRA, K. C.; GONCALVES DE ANDRADE, R. M.; PIAZZA, R. M.; FERREIRA, J. M. JR.; VAN DEN BERG, C. W.; TAMBOURGI, D. Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. **Toxicon**, v.45, p. 421-429, 2005.

de SOUZA, A. L., MALAQUE, C. M., SZTAJNBOK, J., ROMANO, C. C., DUARTE, A. J.; SEGURO, A. C. *Loxosceles* venom-induced cytokine activation, hemolysis, and acute kidney injury. **Toxicon**, v. 51, p. 151- 156, 2008.

DONEPUDI, S.K.; AHMED, K.A.; STOCKS, R.M.; NELSON, D.; THOMPSON, J.W. Aural involvement in loxoscelism: case report and literature review. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v.69(11), p. 1559-61, 2005.

dos SANTOS, V.L.; FRANCO, C.R.; VIGGIANO, R.L.; da SILVEIRA, R.B.; CANTÃO, M.P.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Structural and ultrastructural description of the venom gland of *Loxosceles intermedia* (brown spider). **Toxicon**, England, v.38, p. 265-285, 2000.

DURAN-REYNALS, F. Exaltation de l'activité du virus vaccinal par lês extraits de certains organs. **Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de Ses Filiales**, v.99, p.6–7, 1928.

ELSTON, D. M., EGGERS, J. S., SCHMIDT, W. E., STORROW, A. B., DOE, R. H., MCGLASSON, D.; FISCHER, J. R. Histological findings after brown recluse spider envenomation. **Am J Dermatopathol**, v. 22, 242-246, 2000.

ESCOUBAS, P.; DIOCHORT, S.; CORZO, G. Structure and pharmacology of venom neurotoxins. **Biochimie**, France, v.82, p.893-907, 2000.

FARR, C.; MENZEL, J.; SEEBERGER, J.; SCHWEIGLE, B. Clinical pharmacology and possible applications of hyaluronidase with reference to Hylase "Dessau". **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v.147, p.347–355, 1997.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S.; ELIAS, M. C.; GRANER, E., MANGILI, O. C.; BRENTANI, R. R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, v. 36, 1039 1051, 1998.

FENG, L.; GAO, R., GOPALAKRISHNAKONE, P. Isolation and characterization of a hyaluronidase from the venom of Chinese red scorpion *Buthus martensi*. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v.148(3), p.250-7, 2008.

FERNANDES-PEDROSA, F.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, L.; GONCALVES-DE-ANDRADE, R. M.; KOBASHI, L. S.; ALMEIDA, D. D.; HO, P. L.; TAMBOURGI, D. V. Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. **BMC Genomics**, v. 9, p. 279, 2008.

FISCHER, M. L. Biologia e Ecologia de *Loxosceles intermedia* Mello- Leitão, 1934 (Araneae, Sicariidae), no Município de Curitiba, Paraná. In *Departamento de Zoologia*, Doutorado. Curitiba, PR, Brasil. Universidade Federal do Paraná, 1996.

FORRESTER, L.J.; BARRET, J.T.; CAMPBELL, B.L. Red blood cell lysis induced by the venom of the brown recluse spider. The role of sphingomyelinase D. **Arch. Biochem. Biophys**, v.187, p.335-365, 1978.

FROST, G.I.; CSOKA, T.; STERN, R. The hyaluronidases: a chemical, biological and clinical overview. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v. 8, p.419–434, 1996.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **The American journal of the medical sciences**, United States, v. 304, p.261-267, 1992.

GAJARDO-TOBAR, R. Mi experiencia sobre loxoscelismo. **Mem Inst Butantan**, v. 33, p. 689-698, 1966.

GALLI, S.J.; TSAI, M., PILIPONSKY, A.M. The development of allergic inflammation. **Nature**, v.454(7203), p.445-54, 2008.

GEREN, C. R., CHAN, T. K., HOWELL, D. E. & ODELL, G. V. Isolation and characterization of toxins from brown recluse spider venom (*Loxosceles reclusa*). **Arch Biochem Biophys**, v.174, p.90-99, 1976.

GEREN, C. R., CHAN, T. K., WARD, B. C., HOWELL, D. E., PINKSTON, K. & ODELL, G. V. Composition and properties of extract of fiddleback (*Loxosceles reclusa*) spider venom apparatus. **Toxicon**, v.11, 471-479, 1973.

GERTSCH WJ. **Bol Chil Parasitol**, v. 16, p.2-4, *Loxosceles laeta* (Nicolet), a valid name for the spider causing *Loxosceles* poisoning in South America, 1961.

GIBBS, G.M.; ROELANTS, K.; O'BRYAN, M.K. The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins--roles in reproduction, cancer, and immune defense **Endocr Rev**, v.29, p. 865-897, 2008.

GIRISH, K.S.; KEMPARAJU, K. A low molecular weight isoform of hyaluronidase: purification from Indian cobra (*Naja naja*) venom and partial characterization. **Biochemistry (Moscow)**, v.70, p. 708–712, 2005a.

GIRISH, K.S.; KEMPARAJU, K. Inhibition of *Naja naja* venom hyaluronidase by plant-derived bioactive components and polysaccharides. **Biochemistry (Moscow)**, v.70, p.948–952, 2005b.



GIRISH, K.S.; SHASHIDHARA MURTHY, R.; NAGARAJU, S.; GOWDA, T.V.; KEMPARAJU, K. Isolation and characterization of hyaluronidase a “spreading factor” from Indian cobra (*Naja naja*) venom. **Biochimie**, v. 86, p.193–202, 2004b.

GIRISH, K.S.; KEMPARAJU, K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview, **Life Science**, v.80 (21), p. 1921-43, 2007.

GMACHL M, SAGAN S, KETTER S, KREIL G. The human sperm protein PH-20 has hyaluronidase activity. **FEBS Lett** , v.336, p.545-548, 1993.

GMACHL, M.; KREIL, G. Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.90, p.3569–3573, 1993.

GOMEZ H.F.; MILLER, M.J.; WAGGENER, M.W.; LANKFORD, H.A.; WARREN, J.S.; Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important North American **Toxicon**, v.39(6), p.817-24, 2001.

GONÇALVES DE ANDRADE, R. M.; LOURENÇO, W. R.; TAMBOURGI, D. V. Comparison of the fertility between *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* spiders (Araneae, Sicariidae). **Journal of Arachnology**, v. 28, p. 245-247, 2000.

GRIESBACHER, T.; ZENZ, P.A.M.; RAINER, I.; GRIENGL, S.; LEMBECK, F. *Vespula vulgaris* venom: role of kinins and release of 5-hydroxytryptamine from skin mast cells. **Eur. J. Pharmacol**, v.351, p.95–104, 1998.

HOFFMAN, D.R. Allergens in bee venom III: identification of allergen B as acid phosphatase. **J. Allergy Clin. Immunol**, v. 59, p.364–66, 1977.

HOFFMAN, D.R. Structural biology of allergens from stinging and biting insects. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v.8(4), p.338-42. Review, 2008.

HOFFMAN, D.R; DOVE, D.E.; JACOBSON, R.S. Allergens in Hymenoptera venom. XX. Isolation of four allergens from imported fire ant (*Solenopsis invicta*) venom. **J. Allergy Clin. Immunol**, v.82, p.818–27, 1988.

HOFINGER, E.S.; SPICKENREITHER, M.; OSCHMANN, J.; BERNHARDT, G.; RUDOLPH, R.; BUSCHAUER, A. Recombinant human hyaluronidase Hyal-1:

insect cells versus *Escherichia coli* as expression system and identification of low molecular weight inhibitors. **Glycobiology**, v.17(4), 444-53, 2007.

HOGAN, C. J.; BARBARO, K. C.; WINKEL, K. Loxoscelism: old obstacles, new directions. **Ann Emerg Med**, v. 44, p. 608-624, 2004.

HOTEZ, P.J.; NARASIMHAN, S.; HAGGERTY, J.; MILSTONE, L.; BHOPALE, V.; SCHAD, G.A.; RICHARDS, F.F. Hyaluronidase from infective *Ancylostoma* hookworm larva and its possible function as a virulence factor in tissue invasion and in cutaneous larva migrans. **Infection and Immunity**, v.60, p.1018–1023, 1992.

ISOYAMA, T.; THWAITES, D.; SELZER, M.G.; CAREY, R.I.; BARBUCCI, R.; LOKESHWAR, V.B. Differential selectivity of hyaluronidase inhibitors toward acidic and basic hyaluronidases. **Glycobiology**, v.16, p.11–21, 2006.

JEEP, S.; PAUL, M.; MULLER, U.; KUNKEL, G. Honeybee venom allergy: immunoblot studies in allergic patients after immunotherapy and before sting challenge. **Allergy**, v. 51, p.540–46, 1996.

JOHANSSON, S.G.O. Prevention of allergy and asthma, interim report—introduction. **Eur. J. Allergy Clin. Immunol**, v.55, p.1073–74, 2000.

KALAPOTHAKIS, E.; CHATZAKI, M.; GONCALVES-DORNELAS, H.; DE CASTRO, C. S.; SILVESTRE, F. G.; LABORNE, F. V.; DE MOURA, J. F.; VEIGA, S. S.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; GRANIER, C.; BARBARO, K. C. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitao) venom. **Toxicon**, v. 50, p. 938-946, 2007.

KANG, H. S.; LEE, M. J.; SONG, H.; HAN, S. H.; KIM, Y. M.; IM, J. Y.; CHOI, I. Molecular Identification of IgE-Dependent Histamine-Releasing Factor as a B Cell Growth Factor 1. **The Journal of Immunology**, v. 166, p. 6545-6554, 2001.

KEMPARAJU, K.; GIRISH, K.S. Snake venom hyaluronidase: a therapeutic KHANUM, S.A.; MURARI, S.K.; VISHWANATH, B.S.; SHASHIKANTH, S. Synthesis of benzoyl phenyl benzoates as effective inhibitors for phospholipase A2 and hyaluronidase enzymes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.15, p.4100–4104, 2005.

KING, L. E., JR. Common ground?: Tetracyclines, matrix metalloproteinases, pustular dermatoses, and loxoscelism. **J Invest Dermatol**, v. 127, p. 1284-1286, 2007.

KING, T.P.; HOFFMAN, D.; LOWENSTEIN, H.; MARSH, D.G.; PLATTS-MILLS, T.A.E.; THOMAS, W. Allergen nomenclature. **J. Allergy Clin. Immunol**, v.96, p.5–14, 1995.

KING, T.P.; HOFFMAN, D.; LOWENSTEIN, H.; MARSH, D.G.; PLATTS-MILLS TAE, Thomas W. 1995. Allergen nomenclature. **J. Allergy Clin. Immunol**, v. 96, p.5–14, 2000.

KLOCKER, J.; SABITZER, H.; RAUNIK, W.; WIESER, S.; SCHUMER, J. Combined application of cisplatin, vindesine, hyaluronidase and radiation for treatment of advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. **American Journal of Clinical Oncology**, v.8, p.425–428, 1995.

KOLARICH, D.; LEONARD, R.; HEMMER, W.; ALTMANN, F. The N-glycans of yellow jacket venom hyaluronidases and the protein sequence of its isoform in *Vespula vulgaris*. **FEBS Journal**, v.272, p.5182–5190, 2005.

KREIL, G. Hyaluronidases—a group of neglected enzymes. **Protein Science**, v.4, p.1666–1669, 1995.

KUHN-NENTWIG, L., SCHALLER, J., NENTWIG, W. Purification of toxic peptides and the amino acid sequence of CSTX-1 from the multicomponent venom of *Cupiennius salei* (Araneae: Ctenidae). **Toxicon**, v.32, p.287–302, 1994.

KURPIEWSKI, G.; FORRESTER, L.J.; BARRETT, J.T.; CAMPBELL, B.J. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. **Biochem. Biophys. Acta**, v.678, p.467- 476, 1981.

KUSMA, J.; CHAIM, O. M.; WILLE, A. C.; FERRER, V. P.; SADE, Y. B.; DONATTI, L.; GREMSKI, W.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. **Biochimie**, v. 90, p. 1722-1736, 2008.

LANDUCCI, E.C.T.; DE CASTRO, R.E.; PEREIRA, M.F.; CINTRA, A.C.O.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; DE

NUCCI, G. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A2 homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. **Eur. J. Pharmacol.** 343, 257–263, 1998.

LARSEN, J.N.; LOWENSTEIN, H. Allergen nomenclature. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 97, p.577–78, 1996.

LIN, Y.; MAHAN, K.; LATHROP, W.F.; MYLES, D.G.; PRIMAKOFF, P. A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. **Journal of Cell Biology**, v. 125, p.1157–1163, 1994.

LIU, T.; BAI, Z.; PANG, X.; CHAI, Z.; JIANG, F.; JI, Y. Degranulation of mast cells and histamine release involved in rat pain-related behaviors and edema induced by scorpion *Buthus martensi* Karch venom. **Eur. J. Pharm.**, v.575, p.46–56, 2007.

LU, G.; KOCHOUMIAN, L.; KING, T.P. Sequence identity and antigenic cross reactivity of white face hornet venom allergen, also a hyaluronidase, with other proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.4457–4465, 1995.

LUCAS, S. Spiders in Brazil. **Toxicon** England, v.26, p.759-772, 1988.

LUNG, J.M.; MALLORY, S.B. A child with spider bite and glomerulonephritis: a diagnostic challenge. **Int. J. Dermatol**, v. 39, p. 287-289, 2000.

MACDONALD, S. M.; BHISUTTHIBHAN, J.; SHAPIRO, T. A.; ROGERSON, S. J.; TAYLOR, T. E.; TEMBO, M.; LANGDON, J. M.; MESHNICK, S. R. Immune mimicry in malaria: *Plasmodium falciparum* secretes a functional histamine-releasing factor homolog in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, p. 10829-10832, 2001.

MACHIAH, K.D.; GIRISH, K.S.; GOWDA, T.V. A glycoprotein from a folk medicinal plant, *Withania somnifera*, inhibits hyaluronidase activity of snake venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v.143, p.158–161, 2006.

MAGALHÃES, M.R.; DA SILVA, N.J. JR; ULHOA, C.J. A hyaluronidase from *Potamotrygon motoro* (freshwater stingrays) venom: isolation and characterization. **Toxicon**, v.51(6), p.1060-7, 2008.

MAKRIS, M.; SPANOUDAKI, N.; GIANNOULA, F.; CHLIVA, C.; ANTONIADOU, A.; KALOGEROMITROS, D. Acute generalized exanthematous pustulosis (AGEP) triggered by a spider bite. **Allergol Int.**, v. 58(2), p. 301-3, 2009.

MÁLAQUE, C.M.S.; CASTRO-VALENCIA, J.E.; CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; BARBARO, K.C.; FAN, H.W. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. **Revista do instituto de medicina tropical de São Paulo**, Brazil, v. 44, p.139-143, 2002.

MANZEL, E.J.; FARR, C. Hyaluronidases and its substrate: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. **Cancer Letters**, v.131, p.3–11, 1988.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v.36, p.1749-1800, 1998.

MARKOVIC-HOUSLEY, Z.; MIGLIERINI, G.; SOLDATOVA, L.; RIZKALLAH, P.J., MULLER; U., SCHIRMER, T. Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. **Structure**, v.8, p.1025–1035, 2000.

MARQUES DA SILVA, E.; FISCHER, M.L. Occurrence of species of the genus *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1832 (Araneae: Sicariidae) in the Paraná State. **Anais da Reunião Científica Annual do Instituto Butantan**. São Paulo. p.51. Brasil, 2000.

MARTINEZ-VARGAS, A.Z. Loxoscelismo, um problema de salud en el Perú. **Bol. San. Panam**, v.103, p.378-386, 1987.

MEKORI, Y.A.; METCALFE, D.D. Mast cell in innate immunity. **Immunol. Rev.**, v.173, p.131–140, 2000.

MELLO-LEITÃO. Espécies brasileiras do gênero *Loxosceles* Lowe. **Ann. Acad. Brás. De Ciencias**. VI. 2, 1934.

METCALFE, D.D.; BARAM, D.; MEKORI, Y.A. Mast cells. **Physiol. Rev.** 77, 1033–1079, 1997.

MEYER, K. Hyaluronidases. In: Boyer, P.D. (Ed.), **The Enzymes**. Academic press, New York, p. 307–320, 1971.

MILNE, T.J.; ABBENANTE, G.; TYNDALL, J.D.; HALLIDAY, J.; LEWIS, R.J. Isolation and characterization of a cone snail protease with homology to CRISP proteins of the pathogenesis-related protein superfamily **J Biol Chem**, v.278, p.31105-31110., 2003.

Ministério da Saúde – FUNASA. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes com animais peçonhentos. Brasília; 1998.

MIO, K.; STERN, R. Inhibitors of the hyaluronidases. **Matrix Biology**, v.21, p.31–37, 2002.

MONTEIRO, C. L., RUBEL, R., COGO, L. L., MANGILI, O. C., GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Isolation and identification of *Clostridium perfringens* in the venom and fangs of *Loxosceles intermedia* (brown spider): enhancement of the dermonecrotic lesion in loxoscelism. **Toxicon**, v. 40, p. 409-418, 2002.

MORE, D.; NUGENT, J., HAGAN, L.; DEMAINE, J., SCHWERTNER, H., WHISMAN, B., FREEMAN, T. Identification of allergens in the venom of the common striped scorpion. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v.93(5), p.493-8, 2004.

MOSSNER, R.; LESCH, K.P. Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. **Brain Behav. Immun**, v. 12, p.249–271, 1998.

MS (2008). Ministério da Saúde, Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Acidentes por Animais Peçonhentos no período de 2001 - 2008. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/animaisp/bases/animaisbrnet.def>.> acesso em: 15/01/2010.

MUCKENSCHNABEL, I.; BERNHARDT, G.; SPRUSS, T.; BUSCHAUER, A. Hyaluronidase pretreatment produces selective melphalan enrichment in malignant melanoma in nude mice. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.38, p.88–94, 1997.

NAGARAJU, S.; DEVARAJA, S.; KEMPARAJU, K. Purification and properties of hyaluronidase from *Hippasa partita* (funnel web spider) venom gland extract. **Toxicon**, v.1;50(3), p.383-93, 2007.

NAGARAJU, S.; DEVARAJA, S.; KEMPARAJU, K. Purification and properties of hyaluronidase from *Hippasa partita* (funnel web spider) venom gland extract. **Toxicon**, v.150(3), p.383-93, 2007.

NORDVALL, S.L.; JOHANSSON, S.G.O.; LEDFORD, D.K.; LOCKEY, R.F. Allergens of the imported fire ant. **J. Allergy Clin. Immunol**, v. 82, p.567–76, 1988.

NOVAGEN. **pET System 11<sup>th</sup> Edition**. USA, 2006. Manual.

OSPEDAL, K. Z.; APPEL, M. H.; FILLUS NETO, J.; MANGILI, O. C.; SANCHES VEIGA, S.; GREMSKI, W. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Int J Exp Pathol**, v.83, p. 287-294, 2002.

PADAVATTAN, S.; SCHMIDT, M.; HOFFMAN, D.R.; MARKOVIĆ-HOUSLEY, Z. Crystal structure of the major allergen from fire ant venom, Sol i 3. **J Mol Biol**. v.1, p.178-85, 2008.

PAIXÃO-CAVALCANTE, D.; VAN DEN BERG, C.W.; GONÇALVES-DE ANDRADE, R.M.; FERNANDES-PEDROSA, M.D.E.F.; OKAMOTO, C.K.; TAMBOURGI, D.V. Tetracycline protects against dermonecrosis induced by *Loxosceles* spider venom. **J Invest Dermatol**, v.127(6), p.1410-8, 2007.

PALUDO, K. S.; BISCAIA, S. M.; CHAIM, O. M.; OTUKI, M. F.; NALIWAIKO, K.; DOMBROWSKI, P. A.; FRANCO, C. R.; VEIGA, S. S. Inflammatory events induced by brown spider venom and its recombinant dermonecrotic toxin: a pharmacological investigation. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 149, p. 323-333, 2009.

PATEL, K. D.; MODUR, V.; ZIMMERMAN, G. A.; PRESCOTT, S. M.; MCINTYRE, T. M. The necrotic venom of the brown recluse spider induces dysregulated endothelial cell-dependent neutrophil activation. Differential induction of GM-CSF, IL-8, and E-selectin expression. **J Clin Invest**, v. 94, p. 631-642, 1994.

PAULI, I.; PUKA, J.; GUBERT, I. C.; MINOZZO, J. C. The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. **Toxicon**, v. 48, p. 123-137, 2006



PEIREN, N.; DE GRAAF, D.C.; EVANS, J.D.; JACOBS, F.J. Genomic and transcriptional analysis of protein heterogeneity of the honeybee venom allergen Api m 6. **Insect Mol Biol**. v.5, p.577-81, 2006.

PETERSON, M. E. Brown spider envenomation. **Clin Tech Small Anim Pract**, v. 21, p. 191-193, 2006.

PIPPIRS, U.; MEHLHORN, H.; ANTAL, A.S.; SCHULTE, K.W.; HOMEY, B. Acute generalized exanthematous pustulosis following a *Loxosceles* spider bite in Great Britain. **Br J Dermatol**, v. 161(1), p.208-9, 2009.

PIRQUET, C. Allergie. Münch. **Med. Wochenschr**, v.53, p.1457–1458, 1906.

PLATNICK, N. I. Advances in spider taxonomy 1988-1991: with synonymies and transfers 1940-1980. **New York Entomological Society in association with the American Museum of Natural History**, edn. New York, 1993.

PLATNICK, N.I. The world spider catalog, version 6.0. American Museum of Natural History, 2007. Disponível em: <<http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>> acesso em:

PLATNICK, N.I. The world spider catalog, version 8.5. American Museum of Natural History, 2008. Disponível em: <<http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>> acesso em: 15/01/2010.

PRIMAKOFF, P.; HYATT, H.; MYLES, D.G. A role for the migrating sperm surface antigen PH-20 in guinea pig sperm binding to the egg zona pellucida. **Journal of Cell Biology**, v.101, p.2239–2244, 1985.

PROMEGA. **RNA Analysis Notebook**. Madison, USA. Catálogo de Exposição.

RASH, L.D., KING, R.G., HODGSON, W.C. Evidence that histamine is the principal pharmacological component of venom from an Australian wolf spider (*L. godeffroyi*). **Toxicon**, v. 36, p.367–375, 1998.

RASH, L.D.; HODGSON, W.C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. **Toxicon**, v. 40, p.225–254, 2002.

RASH, L.D.; KING, R.G.; HODGSON, W.C. Sex differences in the pharmacological activity of venom from the white tailed spider (*Lampona cylindrata*). **Toxicon**, v.38, p.1111–1127, 2000.

RATTMANN, Y. D.; PEREIRA, C. R.; CURY, Y.; GREMSKI, W.; MARQUES, M. C.; DA SILVA-SANTOS, J. E. Vascular permeability and vasodilation induced by the *Loxosceles intermedia* venom in rats: involvement of mast cell degranulation, histamine and 5-HT receptors. **Toxicon**, v. 51, p. 363-372, 2008.

RIBEIRO, L.A.; EICKSTEDT, V.R.D.; RÚBIO, G.B.G.; KONALSAISEN, J.F.; HANDAR, Z.; ENTRES, M.; CAMPOS, V.A.F.P.; JORGE, M.T. Epidemiologia do acidente por aranhas do gênero *Loxosceles* no Estado do Paraná (Brasil). **Memórias do Instituto Butantan**, Brazil, v.55, p.19-26, 1993.

RIBEIRO, R. O.; CHAIM, O. M.; DA SILVEIRA, R. B.; GREMSKI, L. H.; SADE, Y. B.; PALUDO, K. S.; SENFF-RIBEIRO, A.; DE MOURA, J.; CHAVEZ OLOTEGUI, C.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. (2007). Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v.50, p.1162-1174.

ROBB, C.W.; HAYES, B.B.; BOYD, A.S. Generalized vasculitic exanthem following *Loxosceles reclusa* envenomation. **J Cutan Pathol**, v. 34(6), p. 513-4, 2007.

RUPPERT, E.E.; FOX, R.S.; BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados**, Editora. Roca. 7 ed. São Paulo, 2005.

SCHENONE, H. [Toxic pictures produced spiders bites in Chile: latrodectism and loxoscelism]. **Rev Med Chil**, v. 131, p. 437-444, 2003.

SCHENONE, H.; LETONJA, T. Notas sobre la biología y distribución geográfica de las arañas del género *Loxosceles*. **Bol. Chil. Parasitol**, v. 30, p.27-29, 1975.

SCHENONE, H.; PRATS, F. Arachnidism by *Loxosceles laeta*. Report of 40 cases of necrotic arachnidism. **Arch Dermatol**, v. 83, p. 139-142, 1961.

SCHENONE, H.; RUBIO, S.; VILLARROEL, F.; ROJAS, A. Epidemiology and clinical course of loxoscelism. A study of 133 cases caused by the bite of the

corner spider (*Loxosceles laeta*)(author's transl). **Bol Chil Parasitol**, v.30, p. 6-17, 1975.

SCHENONE, H.; SAAVEDRA, T.; ROJAS, A.; VILLARROEL, F. Loxoscelismo em Chile. Estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales. **Revista do instituto de medicina tropical de São Paulo**, Brasil, v.31, p.403-415, 1989.

SENF-FRIBEIRO, A.; HENRIQUE DA SILVA, P.; CHAIM, O. M.; GREMSKI, L. H.; PALUDO, K. S.; BERTONI DA SILVEIRA, R.; GREMSKI, W.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. **Biotechnol Adv**, v. 26, p. 210-218, 2008.

SEZERINO, U.M.; ZANNIN, M.; COELHO, L.K.; GONÇALVES, J.; GRANDO, M.; MATTOSINHO, S.G.; BARBARO, K.C. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. **Transactions of the Royal Society of tropical medicine and hygiene**, England, v.92, p.546–548, 1998.

SKOV, L.K.; SEPPÄLÄ, U.; COEN, J.J.; CRICKMORE, N.; KING, T.P.; MONSALVE, R.; KASTRUP, J.S.; SPANGFORT, M.D.; GAJHEDE, M. Structure of recombinant Ves v 2 at 2.0 Angstrom resolution: structural analysis of an allergenic hyaluronidase from wasp venom. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**. v.62(Pt 6), p. 595-604, 2006.

SMS/CE/CVE – SINAM. Secretaria Municipal de Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica. **Boletim Epidemiológico de Curitiba**, 2007.

SOLDATOVA, L.N.; CRAMERI, R., GMACHL, M., KEMENY, D.M.; SCHMIDT, M.; WEBER, M.; MUELLER, U.R. Superior biologic activity of the recombinant bee venom allergen hyaluronidase expressed in baculovirus-infected insect cells as compared with *Escherichia coli*. **J Allergy Clin Immunol**. v.101(5), p.691-8, 1998.

SOUTAR, R. L. & GINSBERG, J. S. Uses of heparin. Ancrod for heparin induced thrombocytopenia. **BMJ**, v.306, p.1410, 1993.

STERN, R. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. **European Journal of Cell Biology**, v. 83, p.317–325, 2004.

SUNDERKOTTER, C., SEELIGER, S., SCHONLAU, F., ROTH, J., HALLMANN, R., LUGER, T. A., SORG, C.; KOLDE, G. Different pathways leading to

cutaneous leukocytoclastic vasculitis in mice. **Exp Dermatol**, v. 10, p. 391-404, 2001.

SWANSON, D. L. & VETTER, R. S. Loxoscelism. **Clinics Dermatol**, v. 24, p. 213-221, 2006.

TAMBOURGI, D. V., PETRICEVICH, V. L., MAGNOLI, F. C., ASSAF, S. L., JANCAR, S.; DIAS DA SILVA, W. Endotoxemic-like shock induced by *Loxosceles* spider venoms: pathological changes and putative cytokine mediators. **Toxicon** 36: 391-403, 1998b.

TEO, A.S.; RAMOS, J.D.; LEE, B.W.; CHEONG, N.; CHUA, K.Y. Expression of the *Blomia tropicalis* paramyosin Blo t 11 and its immunodominant peptide in insect cells. **Biotechnol Appl Biochem**, v.45(Pt 1), p.13-21, 2006.

TREBIEN, H.A.; CALIXTO, J.B. Pharmacological evaluation of rat paw edema induced by *Bothrops jararaca* venom. **Agents Actions**, v. 26, p.292–300, 1989.

VARASTEH, A.R.; MOGHADAM, M.; VAHEDI, F., KERMANI, T.; SANKIAN, M. Cloning and expression of the allergen Cro s 2 profilin from saffron (*Crocus sativus*). **Allergol Int**, v.58(3), p.429-35, 2009.

VEIGA, S. S.; DA SILVEIRA, R. B.; DREYFUS, J. L.; HAOACH, J.; PEREIRA, A. M.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W. Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 38, p. 825-839, 2000.

VEIGA, S.S.; ZANETTI, V.C.; BRAZ, A.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. **Brasilian Journal of medical and biological research**, Brazil, v.34, p.843-850, 2001a.

WASSERMAN, G. S.; ANDERSON, P. C. Loxoscelism and necrotic arachnidism. **J Toxicol Clin Toxicol**, v. 21, p. 451-472, 1983.

WENDELL, R. P. Brown Recluse Spiders: A Review to Help Guide Physicians in Nonendemic Areas. **Southern Medical Journal**, v. 96, p. 486, 2003.

YIANNIAS, J. A. & WINKELMANN, R. K. Persistent painful plaque due to a brown recluse spider bite. **Cutis**, v. 50, p. 273-275, 1992.

YIGIT, N.; BAYRAM, A.; ULASOGLU, D.; DANISMAN, T.; CORAK OCAL, I.; SANCAK, Z. Loxosceles spider bite in Turkey (Loxosceles rufescens, Sicariidae, Araneae). **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 14, p. 178-187, 2008.

YOUNG, A. R.; PINCUS, S. J. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: Loxosceles rufescens, Badumna insignis and Lampona cylindrata. **Toxicon**, v.39, p. 391- 400, 2001.

YUNGINGER, J.W. Insect allergy. **Allergy—Principles & Practice**, v. 2, ed. E Middleton Jr, CE Reed, EF Ellis, NF Adkinso Jr, JW Yunginger, WW Busse, v.75,p.1063–72. St. Louis/New York: Mosby. 1249 pp. 5th Ed, 1998.

ZAHALKA, M.A.; OKON, E.; GOSSLAR, U.; HOLZMANN, B.; NAOR, D. Lymph node (but not spleen) invasion by murine lymphoma is both CD44- and hyaluronate-dependent. **Journal of Immunology** v.154, p.5345–5355, 1995.

ZUO, Y.; PERKINS, N.M.; TRACEY, D.J.; GRECZY, C.L. Inflammation and hyperalgesia induced by nerve injury in the rat: a key role of mast cells. **Pain**, v.105, p.467–479, 2003.

## ANEXOS

### ANEXO 1: Artigo publicado durante o período do mestrado



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



ScienceDirect

Biochimie 90 (2008) 1722–1736

BIOCHIMIE

[www.elsevier.com/locate/biochi](http://www.elsevier.com/locate/biochi)

Research paper

### Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity

J. Kusma<sup>a</sup>, O.M. Chaim<sup>a,b</sup>, A.C.M. Wille<sup>c</sup>, V.P. Ferrer<sup>a</sup>, Y.B. Sade<sup>a</sup>,  
L. Donatti<sup>a</sup>, W. Gremski<sup>a,d</sup>, O.C. Mangili<sup>e</sup>, S.S. Veiga<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, Jardim das Américas, 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>b</sup> Department of Biochemistry, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>c</sup> Department of Structural, Molecular Biology and Genetics, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil

<sup>d</sup> Catholic University of Paraná, Health and Biological Sciences Institute, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>e</sup> Department of Physiology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

Received 16 May 2008; accepted 30 July 2008

Available online 9 August 2008

## **ANEXO 2:** Artigo submetido durante o período do mestrado

**“Atividade de fosfolipase-D e resposta inflamatória induzida pela toxina dermonecrótica da aranha marrom: a membrana da célula endotelial como um alvo para a toxicidade”**

**Autores:** Olga Meiri Chaim, Rafael Bertoni da Silveira, Dilza Trevisan Silva, Valéria Pereira Ferrer, Isabela Castro Rossato, Waldemiro Gremski, Marcos Sérgio Toledo, Helena Bonciani Nader, Silvio Sanches Veiga.

**Revista:** *submetido no periódico Biochemical Journal*

NOTA: Este trabalho está sob processo final de patente no NPI-UFPR.



**ANEXO 3:** Artigo completo durante o período do mestrado a submeter

A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* venomous gland revealed by transcriptome analysis

Gremski, L.H., da Silveira, R.B, Chaim, O.M., Probst, C.M, Ferrer, V.P., Nowatzki, J., Weinschutz, H.C., Madeira, H.M., Nader, H.B., Senff-Ribeiro, A., Veiga, S.S.

## ANEXO 4: Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética em Experimentação Animal  
(CEEA)



Nº 356

### CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

### CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075.052088/2008-32

APROVADO:

07/04/2009 – R.O. 03/2009



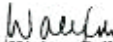
TÍTULO: Clonagem, expressão heteróloga e caracterização de alérgeno e hialuronidases presentes no veneno de *Loxosceles intermedia*

AUTORES: Silvio Sanches Veiga, Valéria Pereira Ferrer, Luiza Helena Gremski, Márcia Helena Appel, Andréa Senff-Ribeiro, Olga Meiri Chaim, Isabela Castro Rossato, Thiago Lopes de Mari

DEPARTAMENTO: Biologia Celular

Prof.ª Dr.ª Ana Maria C. Filadelfi  
Coordenadora do CEEA

## ANEXO 5: Parecer Técnico CTNBio

	<b>Ministério da Ciência e Tecnologia - MCT</b> Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio	
<b>PARECER TÉCNICO Nº 542/2006</b>		
<p><b>Processo nº:</b> 01200.000022/1997-37 <b>Requerente:</b> Setor de Ciências Biológicas – UFPR. <b>CNPJ:</b> 000.348.003/0055-03 <b>Endereço:</b> Centro Politécnico da UFPR- Setor de Ciências Biológicas - 2º Piso, Sala 295 - Caixa Postal 19031 Paraná/PR. <b>Assunto:</b> Solicitação de Extensão do CQB 009/97 <b>Extrato Prévio:</b> 350/2006 Publicado no D.O.U. de 21 de fevereiro de 2006 <b>Reunião:</b> 90ª Reunião Ordinária da CTNBio, ocorrida em 19 de abril de 2006 <b>Decisão:</b> <b>DEFERIDO</b></p>		
<p>A CTNBio, após apreciação do processo de pedido de Parecer Técnico referente à Solicitação de Extensão do CQB (Certificado de Qualidade em Biossegurança) 009/97, conclui pelo DEFERIMENTO, nos termos deste Parecer Técnico. No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.591/05, a Comissão concluiu que o presente pedido atende às normas da CTNBio e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.</p>		
<b>PARECER TÉCNICO</b>		
<p>1) Fundamentação técnica</p>		
<p>Solicita à CTNBio Parecer Técnico para a extensão de seu CQB do Setor de Ciências Biológicas (UFPR) para a sala de número 198B e sala Preparativa, ambas do departamento de Biologia Celular do mesmo setor. Foram apresentados no processo os currículos dos pesquisadores, a planta baixa do laboratório, o projeto a ser desenvolvido nele assim como as medidas de biossegurança.</p>		
<p>2) Medidas de biossegurança descritas no processo.</p>		
<p>Os microrganismos a serem manipulados no projeto (bactérias e leveduras) são da classe de segurança I mas, como os genes a serem expressos (toxinas de animais peçonhentos), apresentam riscos à saúde humana o laboratório que solicita a extensão de CQB tem que ser do tipo NB-2. Embora no processo não haja menção específica sobre a classe laboratorial na qual se encaixa este laboratório, todos os equipamentos apresentados são perfeitamente compatíveis com a classe NB-2, portanto, adequados para as manipulações propostas no projeto. Também foram apresentados as medidas adequadas para o transporte dos microrganismos da sala de manipulação (198B) para a sala de esterilização (sala Preparativa). Além disso, foi informado que as instalações acima mencionadas têm acesso a serviço médico emergencial no próprio setor de Ciências Biológicas da UFPR que contém um centro de atendimento médico para alunos, funcionários e professores além do Hospital Universitário.</p>		
<p>Atendidas as recomendações e as medidas de biossegurança, recomenda-se, contudo, que sejam devidamente observadas as práticas laboratoriais compatíveis com a classe laboratorial NB-2.</p>		
 <b>Dr. Walter Colli</b> <b>Presidente da CTNBio</b>		
<p><b>Secretaria Executiva da CTNBio</b> SPO – Arca 05 – Quadra 03 Bloco B – Térreo – Salas 08 a 10 Brasília, DF – CEP: 70610-200 Fones: (55)(61) 3411 5516 – FAX: (55)(61) 3317-7475</p>		